



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

Marcela Clementino de Araujo

**DETECÇÃO DA MICOTOXINA PATULINA EM
INHAME COM PODRIDÃO-VERDE**

Vitória de Santo Antão

2011

Marcela Clementino de Araujo

**DETECÇÃO DA MICOTOXINA PATULINA EM
INHAME COM PODRIDÃO-VERDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Idjane Santana de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

Vitória de Santo Antão

Ano 2011

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV

A663d Araújo, Marcela Clementino de
 Detecção da micotoxina patulina em inhame com podridão-verde / Marcela
 Clementino de Araújo. _ Vitória de Santo Antão: O Autor, 2011.
 Xiii, 75 folhas:il.; fig.; tab.

 Orientador: Idjane Santana de Oliveira
 Co-orientador: Emerson Peter da Silva Falcão
 Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e meio Ambiente) - Universidade
 Federal de Pernambuco. CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2011.
 Inclui bibliografia e anexos.

 1. Inhame - toxina patulina. 2. *Penicilium sclerotigenum*. 3. Reação em Cadeia
 de Polimerase - PCR. 4. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. I. Título. II.
 Oliveira, Idjane Santana de . III. Falcão, Emerson Peter da Silva.

CDD (21.ed.) 579.5

Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente – Mestrado Acadêmico

MARCELA CLEMENTINO DE ARAÚJO

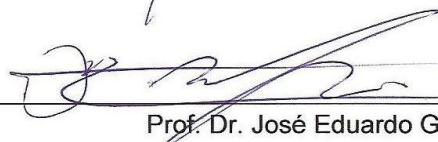
“DETECÇÃO DA MICOTOXINA PATULINA EM INHAME COM PODRIDÃO-VERDE”

DISSERTAÇÃO APROVADA em 28 de fevereiro de 2011

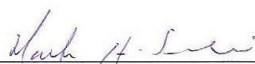
Banca Examinadora



Profa. Dra. Janete Magali de Araújo



Prof. Dr. José Eduardo Garcia



Profa. Dra. Marta Hiromi Taniwaki

Pelo apoio dispensado, ombro doado e torcida pela conquista,
com meu amor e gratidão DEDICO este trabalho
a minha família, MEUS PAIS, MINHA IRMÃ E MEU ESPOSO.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria José Araujo e Mario Araujo, por todo amor, compreensão e dedicação por mim. A minha irmã Karina Araujo, por estar disposta a me ajudar sempre que precisei.

Ao meu esposo Eugenio Moura, por compreender e me oferecer seu ombro e seu auxílio sempre que precisei.

À Dra Idjane Santana de Oliveira, pela orientação concedida principalmente na finalização do trabalho.

Ao Dr. Emerson Peter pela co-orientação neste trabalho que foi de grande importância para sua execução.

Ao Dr. Nicácio Henrique da Silva, Departamento de Bioquímica da UFPE- Laboratório de Química de Produtos Naturais pela disponibilização da infraestrutura laboratorial para análise por CLAE.

Ao Dr. Romero Marinho de Moura, pelas contribuições nos questionamentos sobre um dos elementos principais deste trabalho- o inhamel!

À Dra. Cristina Maria Souza Motta, curadora da Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, pela doação das culturas de *Penicillium*.

Aos professores e funcionários que compõem o curso de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco.

A Maria Adalva Santos e Ana Patrícia Campos da secretaria de Pós-graduação por estarem sempre a postos e prontas para ajudar em tudo que foi necessário nestes dois anos.

Aos colegas da primeira turma de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente.

As amigas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Professora Gláucia Lima, Alexandra Farias, Monalisa Costa e Suellen Tarcyla por toda ajuda prestada em todos os sentidos, muito obrigada.

Às pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
1.3 Revisão da Literatura	4
1.3.1 Cultura do Inhame e doenças fúngicas	4
1.3.2 Podridão-verde do Inhame	6
1.3.3 <i>Penicillium</i> e Metabólitos secundários	8
1.3.4 <i>Penicillium sclerotigenum</i> Yamamoto	10
1.3.5 Micotoxinas	12
1.3.6 Patulina	14
CAPÍTULO 2	24
Detecção da micotoxina patulina em inhame com podridão-verde	
2.1. Resumo	26
2.2 Abstract	26
2.3 Introdução	27
2.4 Material e Métodos	29
3.0 Resultados e Discussão	32
4.0 Agradecimentos	40
5.0. Referências Bibliográficas	40
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 A. *Dioscorea cayennensis* (Inhame da Costa). B. *Dioscorea alata* (Inhame São Tomé). Fonte: arquivo digital 5
- Figura 1.2 Estrutura química da patulina. Fonte: Welke, 2009. 15
- Figura 1.3 Esquema da via biossintética da patulina. Fonte: Puel e Oswald, 2010. 16
- Figura 1.4 Grupamento de genes da via de síntese da patulina em *Aspergillus clavatus* e comparação com outros grupos de genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários de outras espécies fúngicas que apresentam alguns genes relacionados à produção da patulina (Fonte: Puel e Oswald, 2010). 20
- Figura 2.1 A. Túbera comercial de inhame da Costa com podridão-verde e acima o destaque para a área de necrose marrom; B. Rodela de inhame com infecção artificial. C. Cultivo de *P. sclerotigenum* nos meios de cultura CYA, MEA e YES a 25°C. D. Conidióforo biverticilado assimétrico. E. Cultivo em tubo contendo CYA de *P. sclerotigenum* (presença de esclerócios) e ao lado *P. expansum*. 46
- Figura 2.2 Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR do gene *idh*. Amostras de isolados de *Penicillium sclerotigenum* (A) e (B). Da esquerda para direita dois controles negativos* e demais amostras de inhame natural e artificialmente infectados. PM – 1kb. Seta indica o produto de amplificação de 600pb. * Controles negativos -mix de PCR sem DNA e com DNA inhame não infectado. 47
- Figura 2.3 Amplificação do gene *idh* da via de biossíntese da patulina em isolados de *P. sclerotigenum* e outras espécies contaminantes de inhame. Da esquerda para direita, controle positivo (*P. expansum* 331), controle negativo da PCR, cinco isolados de *P. sclerotigenum* PE03, PE12, PE14, PE21, DF02, *P. oxalicum* (4254URM), *P. citrinum* (4216 URM), *P. chrysogenum* (3754 URM), *Aspergillus niger* (4709 URM). PM – 1kb. Seta indica o produto de amplificação de 600pb. 48
- Figura 2.4 Cromatograma da micotoxina patulina por CLAE. A. padrão (sigma). B. inhame naturalmente infectado. 49

Figura 2.5	Cromatograma da micotoxina patulina por CLAE. A – inhame artificialmente infectado. B – isolado PE 12 de <i>P. sclerotigenum</i> .	50
------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Resultados da detecção do gene <i>idh</i> (PCR) e presença de patulina (CLAE) para isolados de <i>Penicillium sclerotigenum</i> e amostras de inhame com podridão-verde em infecção natural e artificial.	51
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Batata Dextrose Agar
CEASA/PE	Centro de Abastecimento Alimentar de Pernambuco
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CYA	Czapek Yeast Autolysate
dNTPS	Didesoxirribonucleotídeo trifosfatado
DL50	Dosagem Letal
FAO	Food and Agriculture Organization
IDH	Isoepoxidon dehidrogenase
Kg	Quilogramas
MEA	Extrato de malte Agar
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
Mg	Miligramas
Ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia de polimerase
URM	University Recife Mycologia
YES	Yeast Extract Sucrose

RESUMO

O inhame é uma cultura de importância econômica e social para a região nordeste do Brasil. A produção e exportação dessa Dioscoreaceae são igualmente afetadas por doenças e pragas no campo e armazenamento, especialmente pela “podridão-verde”, causada pelo fungo *Penicillium sclerotigenum*, microrganismo relacionado à produção da micotoxina patulina, um metabólito secundário. Diante deste fato, foi proposto um estudo de detecção do mencionado metabólito, em amostras de túberas comerciais de inhame da Costa, obtidas na Central de abastecimento de Pernambuco (CEASA-PE). Após a obtenção do isolamento do fungo e preservação por meio de três diferentes técnicas, os mesmos foram utilizados para inoculações artificiais de túberas sadias. Após o período de incubação, foram realizados ensaios moleculares por meio de PCR para detecção do gene *idh* da via de síntese da referida micotoxina, em três amostras de DNA, a saber: 1- isolado fúngico, 2- inhames naturalmente infectado e 3- inhame artificialmente infectado. Foi realizado ainda ensaio analítico por meio de CLAE nas referidas amostras. Os testes de PCR e CLAE foram positivos independente dos três de tipos de amostras utilizadas, em 65,6% indicando relação entre presença do gene *idh* no fungo ou inhame infectado, com produção da patulina. A metodologia de PCR para detecção do gene *idh* em inhame infectado mostrou-se sensível (10 a 30ng de DNA total incluindo o DNA do fungo), reprodutível (obtenção de mesmo resultado em diferentes reações de PCR para as mesmas amostras) e específico para detecção de espécies toxigênicas em inhame, por ter sido positivo apenas para *P. sclerotigenum* e negativo para outras espécies de *Penicillium* que infectam o inhame e que até o momento não foram registradas no Brasil.

Palavras-Chave: *Penicillium*, túbera, toxina, PCR, CLAE, gene *idh*.

ABSTRACT

The yam is crop of high economic and social value to the populations living in the northeast of Brazil. The production and exportation of this Dioscoreaceae are directly affected by diseases and parasites, especially the "green-rot", caused by the fungus *Penicillium sclerotigenum* microorganism related to the production of the mycotoxin patulina, a secondary metabolite. Considering this fact, it was proposed a study on detection of the mentioned mycotoxin in samples of yam tubers of the variety da Costa, collected in Central Market of Pernambuco (CEASA). After obtaining the purified fungus isolates, they were preserved by means of three different techniques. After that, healthy yam tubers under aseptic conditions were artificially inoculated. After the incubation period, molecular tests were performed using PCR test for the gene *idh* present in pathway of synthesis of the patulin in three samples of DNA, as follows: 1-fungal isolate, 2- yams naturally infected and 3- artificially inoculated. Test was also carried out by analytical HPLC in these samples. The PCR test and HPLC were positive in all three type independent of samples used in the experiments in 65%, indicating relationships between the presence *idh* gene in the fungus or infected yam tubers and production of patulin. The PCR methodology for detection of gene *idh* in yam infected (naturally and artificially) with *P. sclerotigenum* was sensitive (10 to 30ng of total DNA including the DNA of the fungus), reproducible (obtaining the same result in different PCR reactions for the same samples) and specific for detection of *Penicillium* mycotoxigenic species in yam, for being only positive for *P.sclerotigenum* and negative for other *Penicillium* species that infect yam so far not reported in Brazil.

Keywords: *Penicillium*, tuber, toxin, PCR, HPLC, gene *idh*.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

O inhame da Costa (*Dioscorea cayennensis* Lam.) é uma cultura de importância social e econômica para a região Nordeste do Brasil por ser um alimento de excelentes qualidades nutritivas, que contém todas as vitaminas do complexo B, amido em grande quantidade e sais minerais. Ademais, o inhame da Costa vem sendo, há muitos anos, produto de exportação para diversos países, incluindo os Estados Unidos, Reino Unido, Países Baixos e França (SANTOS, 2002).

Uma cultura bem conduzida de inhame da Costa é muito rentável (aproximadamente 10.000 dólares por hectare), superando as demais da Zona da Mata do Nordeste, sendo os problemas fitossanitários ainda fatores limitantes da cultura. Entre esses, destaca-se a podridão-verde, causada pelo fungo *Penicillium sclerotigenum* Yamamoto, descrito no Japão em 1955, causando podridão em túberas de inhame chinês (*Dioscorea batatas* Dec.) doença do tipo pós-colheita, de alta severidade, incidente durante o transporte e armazenamento de túberas comerciais e sementes. Essa doença foi descrita no Brasil ocorrendo em Pernambuco por Moura et al. (1976), ocasião em que foi feito breve diagnóstico micológico do patógeno, criada a denominação da doença em português (podridão-verde) e mencionados os fatores de predisposição da doença.

Penicillium sclerotigenum é um fungo com alto poder de disseminação, causando elevadas perdas, além de produzir micotoxinas, especialmente a patulina (FRISVAD; SAMSON, 2004). Essa micotoxina é produzida principalmente por *P. expansum* Lam em maçã, sendo responsável por cerca de 70 a 80% da deterioração de frutas armazenadas (WELKE et al., 2009).

As micotoxinas, compostos provenientes de vias metabólicas comumente presentes em fungos, proliferam em produtos agrícolas destinados à alimentação e podem acarretar sérios danos à saúde humana e de animais. Muitos fatores biológicos contribuem para a ocorrência de micotoxinas na cadeia alimentar, com ênfase à susceptibilidade dos vegetais à infecção fúngica, assim como fatores ambientais constituídos de temperatura,

umidade, atividade de água dos alimentos e danos mecânicos durante colheita e estocagem. Somam-se ainda os problemas oriundos de avanços tecnológicos, que visando à comercialização internacional, estocam os frutos nos períodos de entressafras sob condições que permitem o desenvolvimento de fungos psicrotróficos, representados especialmente por *Penicillium* spp (ROSS et al., 1998).

Desde a década de 40, a patulina tem sido objeto de estudo, primeiramente por sua ação como antibiótico e depois por suas propriedades fetotóxicas e carcinogênicas. (MOAKE, 2005). Foi reportada como sendo tóxica para ratos, teratogênica para embriões de galinha e imunossupressora em camundongos e coelhos. Em humanos, os efeitos tóxicos da patulina ainda não são conclusivos, mas já foram relatados casos de distúrbios gastrintestinais, náuseas e vômito em decorrência do consumo de derivados de maçã contaminados com essa micotoxina (WELKE et al., 2009).

Apesar do método padrão ouro para detecção da micotoxina patulina ser a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Paterson et al. (2003) descreveram uma sequência de *primer* para o gene da enzima isoeopoxidon dehidrogenase (*idh*) da via metabólica de síntese para patulina em *Penicillium* sp. A partir do estudo deste gene foi possível detectar por PCR a presença de fungo toxicogênico, especialmente *P. expansum* em alguns alimentos, principalmente maçã e pêssego, concluindo que a detecção do gene *idh* é um recurso para triagem de controle para fungos toxicogênicos em alimentos. No entanto, ainda não havia sido aplicada a detecção molecular por PCR para a combinação de infecção *P. sclerotigenum* em inhame. Além disso, não há na literatura relato de análise de inhame para detecção da patulina.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Detectar a produção de patulina por *P. sclerotigenum* em inhame com podridão-verde.

1.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Formar coleção de isolados de *P. sclerotigenum*, oriundos de diferentes áreas produtivas de inhame;
- ✓ Preservar os isolados fúngicos por três diferentes métodos;
- ✓ Padronizar a extração de DNA genômico e PCR para detecção molecular do gene *idh* em culturas puras de *P. sclerotigenum* e em inhame naturalmente e artificialmente infectados por *P. sclerotigenum*;
- ✓ Extrair patulina produzida por *P. sclerotigenum* e identificá-la por CLAE, em culturas puras do fungo e inhame naturalmente e artificialmente infectados;

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Cultura do Inhame e Doenças Fúngicas

O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma monocotiledônea, herbácea, pertencente à família Dioscoreaceae, cujo órgão de reserva é conhecido como túbera que pode ser utilizada para plantio (semente) ou consumo (comercial). O gênero *Dioscorea* possui cerca de 600 espécies originárias da África, Ásia ou América do Sul (SANTOS, 1996). Desde seus locais de origem, domesticação e cultivo na Ásia, têm sido chamado de “inhame” (yams, ignames, ñames). Esses nomes também são utilizados nos países onde são cultivados, como na África e nas Américas (SEGNU, 1992).

As espécies *D. cayennensis* Lam. e *D. rotundata* Poir., internacionalmente conhecidas como inhame amarelo ou da Costa (“yellow yam”) e inhame branco (“white yam”), originaram-se no continente africano (COURSEY, 1980; AMUSA et al., 2000). Estas duas espécies têm sido reunidas num complexo denominado *D. cayennensis* - *D. rotundata* (MALAURIE et al., 1998). O Inhame-da-Costa ou Cará-da-Costa, cultivar mais utilizada no Brasil, apresenta as características do inhame branco e pertence a este complexo, sendo referido como uma cv. de *D. cayennensis* (MOURA, 2005).

O ciclo do inhame é anual e uma planta pode produzir dois tipos de túberas: as comerciais, colhidas cinco a seis meses após o plantio, e as sementes, colhidas três meses após as túberas comerciais (SILVA, 1965). Estas constituem em produto agrícola de importante valor comercial no mercado interno e externo, sendo um alimento rico em carboidratos, especialmente amido, sais minerais e vitaminas do complexo B. Espécies e variedades comestíveis de inhame produzem alimentos básicos para a subsistência de muitas populações em muitos países do oeste da África, Caribe, regiões norte, central e sudeste da Ásia, incluindo-se parte da China, Japão, Malásia, Vietnã e Oceania (SANTOS, 2002; OKIGBO, 2002).

Dioscorea cayennensis, com uma única variedade, conhecida por inhame da Costa (Figura 1.1A), é a mais importante para o consumo no Nordeste do Brasil e única nos programas de exportação. *Dioscorea alata* conhecida na região Nordeste como cará São Tomé (Figura 1.1B), porém pouco cultivadas na Paraíba e Pernambuco por serem altamente

suscetíveis à doença requeima, de alta severidade e etiologia ainda desconhecida, ocorre, apenas nesses Estados do Nordeste brasileiro (SANTOS, 2002).

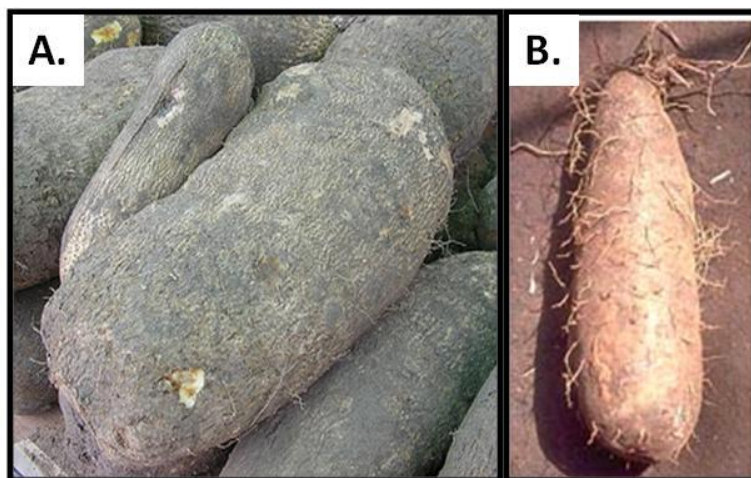


Figura 1.1: A. *Dioscorea cayennensis* (Inhame da Costa). B. *Dioscorea alata* (Inhame São Tomé). Fonte: arquivo digital.

Em termos de produção de inhame por área plantada, os países africanos como Nigéria e Costa do Marfim dominam o cenário internacional (FAO, 2009). O Brasil produziu em 2008 cerca de 250.000t de inhame anualmente com área plantada de 27.000ha (FAO, 2011). Nacionalmente, o Nordeste é o maior produtor, sendo nesta região que se concentram aproximadamente 90% de todo o inhame produzido no país, com destaque para os Estados de Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão (GARRIDO, 2005; OLIVEIRA, 2005).

No mundo, a cadeia produtiva do inhame constitui expressiva atividade geradora de empregos e renda, movimentam cifras superiores a 150 milhões de dólares anuais, além de promover a fixação do homem no campo, exigindo cerca de 1,25 homem por hectare de área plantada. O Brasil exporta anualmente milhares de toneladas de inhame para os Estados Unidos, Reino Unido, Países Baixos, Canadá e França. Os índices de exportação para esses países encontram-se estáveis, com indicações de diminuição. As exigências quanto à qualidade das túberas com relação à sanidade (ausência total de sintomas de doenças), aspecto geral (uniformidade, tamanho e peso) e toxicologia (ausência de resíduos de agrotóxicos) têm aumentado bastante nos últimos anos, indicando a necessidade de maiores incentivos à pesquisa para que os agricultores possam receber melhores orientações técnicas que favoreçam a obtenção de colheitas mais racionais e conseqüentemente túberas de melhor qualidade para seleção de exportação (SANTOS, 2002).

O cultivo do inhame da Costa em todas as regiões produtoras do mundo, incluindo-se o Nordeste, é afetado significativamente pela ocorrência de doenças, com destaques para as causadas por fungos e nematóides, todas limitantes da produtividade, caso medidas preventivas não sejam aplicadas (RITZINGER et al., 2003; MOURA, 2005). Entre as doenças fúngicas, destacam-se a queima das folhas ou pinta preta, causada por *Curvularia eragrostides* (P. Henn.) Mayer, originalmente descrita no Nordeste como causada por *Curvularia maculans* (Bancroft) Boedijn var. *macrospora* (MEDEIROS; NASCIMENTO, 1964), denominação que passou a sinonímia de *C. eragrostides*, a partir do trabalho de Ellis (1966). Trata-se de uma doença epidêmica, de ocorrência regular, que exige controle químico preventivo obrigatório. Seus efeitos se refletem em baixa produtividade, com redução significativa do tamanho das túberas e alterações negativas nas características organolépticas (MOURA, 2005). Não é a doença mais importante do inhame porque é mais freqüente em *Dioscorea alata*, cará São Tomé, ou seja, numa espécie de inhame de pouca expressão econômica (MOURA, 2005).

Outra doença fúngica da cultura do inhame ocorrente no Nordeste é a podridão-aquosa, descrita por Moura (1987) que tem como agente etiológico *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerl, só assinalada em *D. cayennensis*, sendo de ocorrência regular, em períodos chuvosos. As incidências de podridão-aquosa ocorrem principalmente quando fortes precipitações pluviométricas inundam áreas baixas dos campos de plantio. No solo, na presença de altos teores de umidade, muitas túberas, rapidamente, passam a apresentar podridão do tipo mole, sem odor, com abundante desenvolvimento micelial e grande quantidade de esporângios na superfície, logo após serem colhidas (MOURA, 2005).

A doença fúngica que mais preocupa os produtores e exportadores de inhame devido as perdas econômicas é a podridão-verde, incidente em túberas comerciais e sementes, causada por *Penicillium sclerotigenum*, descrita em Pernambuco por Moura et al. (1976), ocasião em que foi dado à doença o nome de podridão-verde, descrita a sintomatologia, apresentadas as condições de predisposição e feita uma breve descrição do patógeno.

1.3.2 Podridão-Verde do Inhame

A podridão-verde é problema fitossanitário de pós-colheita, com o patógeno penetrando sempre por ferimentos, resultando em altas perdas durante o transporte e armazenamento de túberas comerciais e sementes. As perdas são permanentes e a doença ocorrendo sempre com altos índices de incidência e severidade, especialmente em épocas

chuvosas, que promovem altos teores de umidade nos armazéns. Perdas também ocorrem em porões de navios, por ocasião das longas travessias oceânicas, durante as exportações, fato que exige eficientes medidas preventivas de controle (MOURA, 2005).

Dentre as espécies do subgênero *Penicillium* que já foram assinaladas associadas à podridão em inhame, *P. sclerotigenum* destaca-se por ser a mais freqüente e virulenta no mundo (OKIGBO, 2004). Outras espécies de *Penicillium* foram identificadas na Nigéria como agentes etiológicos de podridões em inhame, mas segundo Oliveira et al.(2007) que realizaram estudo sobre a distribuição geográfica de *P. sclerotigenum* no Brasil outras espécies ainda não foram assinaladas ocasionando a podridão-verde, a saber: *P. chrysogenum* Thom, *P. expansum* (Link) Thom, *P. italicum* Wehmer e *P. oxalicum* (OKIGBO, 2004).

A podridão-verde quando em túberas-semente induz estiolamento de pré e pós-emergência, obrigando os agricultores a efetuarem replantio, 45 dias após o plantio, trazendo, como consequência, a presença de túberas comerciais em diferentes estádios de maturação por ocasião da colheita, o que gera prejuízos ao consumidor por adquirir túberas imaturas que possuem sabor amargo e são de difícil cocção (SANTOS, 2002).

Em geral, o primeiro sintoma perceptivo da podridão-verde do inhame é uma pequena mancha úmida, sempre associada a ferimentos na túbera. Nessa fase o patógeno já penetrou e encontra-se colonizando os tecidos internos, originando uma lesão profunda, úmida, de coloração marrom (MOURA, 2005). Cortando-se transversalmente túberas com os sintomas descritos da periferia para a parte interna, verifica-se necrose dos tecidos, com aspecto de podridão úmida, de coloração marrom, que se estende a alguns centímetros do raio da lesão, semelhante ao observado em meio de cultura, quando do isolamento do fungo. A podridão evolui rapidamente e em pouco tempo toda a túbera fica comprometida, tornando-se imprestável para o consumo humano (SANTOS, 1996). A fase de reprodução do patógeno tem início com o aparecimento sobre a lesão de uma camada de cor verde, formada por conidióforos e conídios. Mais tarde, ao iniciar a saprogênese, *P. sclerotigenum* pode produzir grande quantidade de esclerócios dentro dos tecidos colonizados, já secos, sendo a presença dessas estruturas uma das principais características do fungo.

O patógeno dissemina facilmente de uma túbera para outra em condições de armazenamento e/ou através do contato direto. Ferimentos realizados nas etapas de colheita, transporte e embalagem, bem como decorrentes do parasitismo de fitonematóides, predis põem as túberas sadias à infecção pelo contato direto com túberas doentes. A doença é favorecida pelas condições de armazenamento que proporcionam altas temperaturas e umidade do ar, pouca ventilação e baixa luminosidade. Além disso, as áreas de

armazenamento infestadas são importantes focos de disseminação do inóculo do patógeno (ALVES, 2002).

O controle preventivo da podridão-verde pode ser realizado colhendo-se e manuseando-se com cuidado túberas comerciais e sementes após a colheita e mantendo-se boas condições sanitárias durante o armazenamento (MOURA, 2005). Moura (1980), verificou que o tratamento por imersão das túberas-sementes em solução de Benomyl, nas concentrações de 1,25 a 2,5mg/mL de princípio ativo, durante 30 minutos, controlou a doença durante o armazenamento e essa prática tem sido utilizada pelos exportadores com relativo sucesso. Controle químico da podridão-verde com resultados satisfatórios foi obtido também por NNODU e NWANKITI (1986) ao compararem a eficiência de cinza de madeira e Hipoclorito de sódio em substituição ao uso de Benomyl e Thiabendazole. A aplicação de *Bacillus subtilis* (Enrenberg) Cohn em túberas comerciais de *D. rotundata* controlou com sucesso *P. sclerotigenum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium moniliforme* durante cinco meses de armazenamento após o tratamento (OKIGBO, 2002).

São poucas as informações epidemiológicas disponíveis sobre a podridão-verde do inhame no mundo. Ogundana et al. (1970) mencionaram *P. sclerotigenum* entre outros fungos, como causadores de podridão do inhame na Nigéria sendo, na ocasião, assinalada a espécie *P. italicum* Wehnmer e *P. expansum* Lam associados à doença. Adeniji (1970) reportou alta ocorrência de *P. oxalicum* Currie & Thom, causando podridão de túberas do inhame também na Nigéria. Além disso, os registros na literatura mundial envolveram estudos com máximo de oito isolados. Essas espécies não foram registradas ocorrendo em inhame no Brasil, segundo levantamento realizado por Oliveira et al. (2007). Os autores estudaram 50 isolados de *P. sclerotigenum* oriundos de diversos estados brasileiros tais como: São Paulo, Bahia, Distrito Federal, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, e Rondônia. Os cinquenta isolados provenientes de inhame com os sintomas da podridão verde foram identificados como agente etiológico unicamente *P. sclerotigenum*.

1.3.3 *Penicillium* e Metabólitos secundários

O gênero *Penicillium* constitui um grupo de microrganismos que sintetizam elevada quantidade de metabólitos secundários, atingindo em certos casos, uma produção 73% superior a de outras classes de microrganismos (CAFÊU et al., 2005). Espécies de *Penicillium* têm uma alta diversidade, tanto morfológica quanto de metabólitos secundário, a exemplo de antibióticos, micotoxinas, antioxidantes, anticancerígenos, inseticidas, herbicidas, enzimas e fungicidas (FRISVAD et al., 2004). Rancic et al. (2006), reportaram

que existe um grande número de extratos de fungos e/ou produtos extracelulares com atividade antimicrobiana, sobretudo de espécies de *Penicillium* sp. Entre outros, *P. brevicompactum*, *P. carneus*, *P. citrinum*, *P. chrysogenum*, *P. dipodomyis*, *P. flavigenum*, *P. funiculosum*, *P. griseofulvum*, *P. nalgiovense*, *P. nordicum*, *P. persicinum* são espécies relatadas como fontes de antibióticos, especialmente de penicilina e griseofulvina (WANG et al., 2004, PITT, 2000).

O primeiro metabólito fúngico de notória eficácia foi, sem dúvida, a penicilina, substância produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, cuja capacidade de inibir o crescimento bacteriano foi descoberta acidentalmente por Fleming, em 1928. Seu emprego em larga escala no início da década de 40, fruto dos esforços dos pesquisadores ingleses Forey e Chain, levou à redução do índice de mortandade de soldados de 39% durante a Primeira Guerra Mundial para 3,9%, na Segunda Guerra (KOROLKOVAS, 1988).

Espécies do gênero *Penicillium*, estabelecido por Link em 1809, têm sido reportadas causando podridões de túberas em *Dioscorea* spp. Este gênero pertence à família Trichocomaceae e caracteriza-se pela produção de conídios em cadeias no vértice de fiáldes, com os conidióforos apresentando estrutura morfológica semelhante a pequenos pincéis. O gênero *Penicillium* possui ampla distribuição na natureza (FRISVAD; SAMSON, 2004) e o primeiro trabalho que sumarizou todas as espécies de *Penicillium* com descrição morfológica de cada espécie foi o de Raper e Thom (1949).

Fungos do gênero *Penicillium* são conhecidos por sua ubiquidade e caracterizados geralmente pela formação abundante de esporos, sendo amplamente estudados. Alguns metabólitos secundários, como o ácido micofenólico ativo contra bactérias Gram-positivas, são produzidos por várias espécies deste gênero (*P. brevicompactum*, *P. paxilli*, *P. olivicolor*, *P. canescens*, *P. roqueforti*, *P. viridicatum*, *P. rugulosum* e *P. expansum*) sendo, portanto, considerados marcadores em algumas espécies (VINOKUROVA et al., 2005). Outros gêneros, como o *P. tulipae*, possuem marcadores específicos do gênero, como a epineoxalina até então relatada apenas neste gênero (OVERY et al., 2006).

Apesar da maioria dos estudos envolvendo metabólitos bioativos de *Penicillium* ser realizados com esporos ou amostras miceliais, as estruturas de resistência denominadas esclerócios presentes em algumas espécies de *Penicillium* já foram descritas na literatura mundial como possuidora de atividade biológica inseticida e bactericida.

Esclerócios fúngicos são estruturas produzidas por algumas espécies fúngicas visando sua sobrevivência por períodos prolongados em condições ambientais desfavoráveis. Os estudos nesta área sugerem que a presença de substâncias inseticidas em altas concentrações, especificamente em esclerócios, deve estar associada a um

mecanismo de defesa, evitando que os esclerócios sejam consumidos por insetos (OH et al., 1998). O estudo de extratos provenientes de esclerócios de *Penicillium raistrickii* levou ao isolamento de griseofulvina, 6-desmetilgriseofulvina, além de quatro substâncias inéditas, 3,3"-di-hidroxi-6'-desmetilterfenilina, 3'-demetoxi-6'-desmetil-5'-metoxicandidusina B, 6'-desmetil-candidusina B e a metil-3,4,6,8-tetra-hidroxixantona. A substância griseofulvina, 6-desmetilgriseofulvina apresentou moderada atividade contra *S. aureus* e o metabólito metil-3,4,6,8-tetra-hidroxixantona foi ativo contra *B. subtilis* (BELOFSKY et al., 1998).

1.3.4 *Penicillium sclerotigenum* Yamamoto

Penicillium sclerotigenum foi descrito no Japão (YAMAMOTO et al., 1955), causando podridão em túberas de inhame chinês (*Dioscorea batatas* Dec.). Moura et al. (1976) fizeram descrição morfológica fundamentada em um único isolado. Os dados morfométricos para o isolado brasileiro estudado foram compatíveis com os descritos para o material tipo no Japão. A primeira citação desse fungo em manuais para identificação de espécies de *Penicillium* aconteceu em 1979, na ocasião da publicação de Pitt, para taxonomia de espécies dos gêneros *Penicillium*, *Eupenicillium* e *Talaromyces*. *Penicillium sclerotigenum* não seria incluído nas edições posteriores. Nessa publicação *P. sclerotigenum* foi classificado inicialmente como pertencente ao subgênero *Furcatum* devido à presença de conidióforos biverticilados assimétricos (PITT, 1979). Porém, em culturas recentes de *P. sclerotigenum* muitos conidióforos triverticiliados foram observados sendo a espécie posteriormente reclassificada como pertencente ao subgênero *Penicillium*, série *Gladioli*, por produzir esclerócios (SAMSON; PITT, 2000)

Não há referência na literatura sobre a existência da forma teleomorfa de *P. sclerotigenum*. Em 1983, *P. sclerotigenum* foi colocada na sinonímia de *P. turbatum* Westling por Stolk e Samson (1983). Estes autores consideraram que os conídios das duas espécies apresentavam dimensões idênticas, bem como mesmo padrão biverticilado de conidióforo, além de esclerócios. Porém, Peterson (2000), analisando seqüências de nucleotídeos com aproximadamente 1240pb, correspondendo às regiões ITS 1 e ITS 2, 5,8S DNAr e parte da subunidade maior do DNA ribossomal, observou considerável distância genética para o DNAr entre as duas espécies que foram classificadas separadamente. *Penicillium turbatum* ficou no subgênero *Aspergilioides* (grupo ITS 4) e *P. sclerotigenum* foi agrupado no subgênero ainda na época *Furcatum* (grupo ITS 6). A espécie geneticamente

mais próxima de *P. sclerotigenum* foi *P. digitatum*, classificada também como pertencente ao grupo ITS 6. Ambas são patogênicas a plantas, apresentam conidióforo biverticilado e produção de metabólitos secundários.

Frisvad e Samson (2004) durante a revisão de *Penicillium* subg. *Penicillium* levando em consideração as características morfofisiológicas, nutricionais, metabólitos secundários e moleculares agruparam *P. sclerotigenum* na série *Expansa*, formada pelas espécies *P. expansum* e *P. marinum* Frisvad & Samson. Nesta série as espécies apresentam conidióforos bi ou triverticilados, conídios subglobosos, ramos longos com parede lisa, ocasionalmente rugosa em meio de cultura MEA (Agar extrato de malte). As três espécies da série *Expansa* apresentam aparência geral da colônia semelhante e produção de patulina, roquefortina C e geosmina.

A mais completa descrição de *P. sclerotigenum* foi publicada por Frisvad e Samson (2004), utilizando de oito isolados. Além dos dados morfológicos, foram apresentadas pelos autores informações outras, tais como produção e identificação de metabólitos secundários e seqüenciamento do gene da beta-tubulina. Oliveira et al.(2006) estudaram a patogenicidade do *P. sclerotigenum*, em quinze frutas e hortaliças diferentes e seus resultados demonstraram que maçã, pêra e banana, além das testemunhas positivas inhame da Costa (*Dioscorea cayennensis*) e, inhame nambu (*D. alata*), foram suscetíveis ao *P. sclerotigenum*, outras espécies estudadas foram moderadamente suscetíveis como a batata inglesa, beterraba, berinjela e inhame taro, e algumas foram resistentes como o chuchu, cenoura, mamão, pepino, abobrinha, batata doce e aipim.

Frisvad e Samson (2004), estudando 58 espécies diferentes do gênero *Penicillium*, verificaram que a produção da roquefortina foi o metabolito secundário mais comumente produzido e destacou que entre as espécies produtoras de roquefortina C e precursora da roquefortina D, estavam, *P. carneum*, *P. crustosum*, *P. dipodomyicola*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. marinum*, *P.paneum*, *P. persicinum*, *P. roqueforti* e *P. sclerotigenum*.

Joshi et al. (1999), identificaram a produção de esclerotigenina a partir do ácido antranílico, por isolados de *P. sclerotigenum*, sendo esta substância classificada como benzodiazepina com atividade inseticida. Eles atribuíram à produção de esclerotigenina, também chamada aurantine B, à longevidade dos esclerócios como uma forma de proteção destes. Entretanto, Larsen et al. (2000), observaram a produção de esclerotigenina em conídios e micélio de isolados de *P. sclerotigenum* que não produziram esclerócios, sendo a esclerotigenina encontrada intra e extracelularmente.

Por se tratar de uma espécie do gênero *Penicillium*, gênero reconhecidamente produtor de antibióticos, possivelmente algum metabólito secundário com atividade

antimicrobiana poderia ser isolado de *P. sclerotigenum*, sendo esta indicação confirmada com o trabalho de Clarke e Mckenzie (1967). Esses autores identificaram a produção de griseofulvina em extratos de micélio de isolados de *P. sclerotigenum*, após bioensaio com *Botrytis allii* Munn. Outras espécies de *Penicillium* também produzem griseofulvina, sendo a principal *P. griseofulvum* Dierckx.

Outras substâncias de importância médica, além dos antibióticos, e produzidas por várias espécies do gênero *Penicillium*, são as micotoxinas. Estas são produtos naturais de baixo peso molecular, produzidas como um dos metabólitos secundários durante o crescimento de fungos filamentosos (DINIZ, 2002). Dentre as várias micotoxinas identificadas e que apresentam efeitos tóxicos para homens e animais, a patulina é a única descrita até o momento como sendo produzida, embora não exclusivamente, por *P. sclerotigenum* (FRISVAD et al., 2004).

1.3.5 Micotoxinas

O termo micotoxina é derivado da palavra grega *Mykes* que significa fungo e *Toxicum* que significa veneno ou toxina. As micotoxinas são metabolitos secundários com elevada toxicidade produzidos por fungos filamentosos que provocam a deterioração de alimentos. Quimicamente as micotoxinas são moléculas relativamente pequenas, mas com grande diversidade estrutural e por isso com variados efeitos biológicos (SONGSERMSAKUL, P.; RAZZAZI-FAZELI, 2008).

Estas toxinas são de grande importância em termos econômicos e de saúde pública. Do ponto de vista econômico, causam prejuízos a produtores, processadores e comerciantes de alimentos e ao país como um todo, inclusive na redução de divisas quando os produtos exportados são recusados no exterior devido à presença de micotoxinas. Anualmente, de 25 a 50% da safra de frutas e vegetais são destruídos por fungos. O desenvolvimento de fungos em alimentos não implica necessariamente na presença de micotoxinas, mesmo tratando-se de um gênero potencialmente toxigênico. Porém há um risco implícito e que deve ser afastado. Do ponto de vista de saúde pública, a ONU estima que 40% da redução na expectativa de vida em países pobres, está relacionada com a existência de micotoxinas na dieta destas populações (KAWASHIMA, 2004).

Entre as micotoxinas de grande interesse para a Saúde Pública e de importância agroeconômica estão as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos e zearalenona. Outras micotoxinas podem tornar-se alvo de estudo com a descoberta de novos dados

experimentais ou epidemiológicos, como fumonisinas, patulina e verruculogeno. É importante ressaltar que uma única espécie de fungo é capaz de produzir uma ou várias micotoxinas, e uma mesma micotoxina pode ser produzida por diferentes espécies de fungos (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

A exposição humana e de animais às aflatoxinas ocorre predominantemente pela ingestão de alimentos e rações contaminados, especialmente cereais e grãos, como milho, trigo, amendoim, entre outros. Dezoito diferentes tipos de aflatoxinas foram identificados, mas somente as aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂) foram detectadas como contaminantes naturais de rações e ingredientes, sendo a AFB₁ de maior toxicidade (MOSS, 1998). A contínua ingestão de AFB₁ por animais em lactação leva à excreção de aflatoxina M₁ (AFM₁) no leite (PARK; POHLAND, 1986). Os efeitos tóxicos carcinogênicos da AFM₁ têm sido extensivamente demonstrados em espécies de laboratório (RILEY; PESTKA, 2005).

Rocha et al. (2008) verificaram a incidência de contaminação por aflatoxinas em amostras de amendoim e paçocas e constatou que 38% das amostras de amendoim e 13% das amostras de paçoca comercializadas na cidade de Alfenas em Minas Gerais estavam contaminadas. Foi detectado que 9,5% das amostras apresentaram simultaneamente as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, todavia, em todas as amostras positivas, de amendoim e de paçoca, os níveis encontrados excederam o limite máximo permitido pela legislação brasileira.

Outra micotoxina de importância são as ocratoxinas produzidas através de metabolismo secundário por vários fungos dos gêneros *Aspergillus* ou *Penicillium*. A família de ocratoxinas é composta por três membros, A, B e C, que diferem ligeiramente umas das outras em estruturas químicas. Essas diferenças, contudo, tem efeito sobre os seus respectivos potenciais tóxicos. A ocratoxina A é a mais abundante e portanto, mais comumente detectada sendo também mais tóxica do que B e C afetando principalmente os rins. Como em outras micotoxinas, ocratoxina A pode contaminar uma grande variedade de alimentos como resultado da infecção dos fungos em culturas, no campo durante o crescimento, no momento da colheita, no armazenamento e no transporte sob condições ambientais favoráveis, especialmente quando não são devidamente secas. A ocratoxina A pode estar presente em um alimento, mesmo quando o bolor não é visível (LI, 1997). A ocratoxina A pode ser encontrada como contaminante principalmente nos cereais (cevada, arroz, milho, trigo, sorgo) e derivados, mas também tem sido relatada em café, uvas, cerveja, vinho, chocolate, carne, leite e derivados e especiarias (BENFORD et al., 2001).

Praticamente todos os cereais e seus derivados podem ser contaminados pela micotoxina zearalenona (ZEA), mas esta tem sido mais encontrada em trigo e milho, principalmente em milho em vários países (SCUDAMORE; PATEL, 2000). O milho produzido no Estado de São Paulo foi analisado por Machinski Jr et al. (2000) e em 120 amostras apenas uma se apresentou contaminada (4640 µg/Kg). A ZEA é um componente não esteroideal, metabólito secundário de fungos do gênero *Fusarium* (DIEKMAN; GREEN, 1992). O desenvolvimento do *Fusarium* e a produção de ZEA estão relacionados a temperaturas e umidade elevadas. O *Fusarium* modifica os componentes da parede celular e secreta enzimas de características digestivas, que alteram a composição nutricional dos grãos (MATTHÄUS et al., 2004).

As micotoxinas fumonisinas são produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* sendo freqüentemente isolados de milho (JECFA, 2001). As fumonisinas, principalmente a fumonisina B1, têm sido detectadas em todos os tipos de produtos derivados de milho (HENNIGEN et al., 2000a; HENNIGEN et al., 2000b). No Brasil, como ocorre em outras partes do mundo, há uma alta contaminação de milho e produtos derivados com fumonisinas. A atividade carcinogênica e a termoestabilidade são fatores que caracterizam as fumonisinas como um grande fator de risco para a saúde humana e animal. Dentre os efeitos causados observa-se constantemente doenças fatais, tanto em homens como em animais. Nos eqüinos provocam a leucoencefalomalácia (LEM) e, em suínos, edema pulmonar (LÁZZARI, 1993). Apresentam ainda efeito indutor de formação de câncer em seres humanos (SCUSSEI, 1998).

Apesar das principais micotoxinas contaminarem com freqüência alimentos secos, especialmente cereais, devido à baixa atividade de água desses alimentos, em frutas e sucos de frutas industrializados, tais como maçã e pêssego predominam a contaminação por patulina.

1.3.6 Patulina

Na década de 40, a patulina foi isolada pela primeira vez por Birkinshaw et al. (1943) a partir de *Penicillium griseofulvum* e *Penicillium expansum*.

A micotoxina patulina, é produzida por algumas espécies de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssoschlamys*. As espécies de *Penicillium* que já foram identificadas como produtoras de patulina são: *P. carneum*, *P. clavigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. dipodomyicola*, *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. gladioli*, *P. griseofulvum*, *P.*

marinum, *P. paneum*, *P. sclerotigenum* e *P. vulpinum* (FRISVAD et al., 2004). Quimicamente, a patulina é uma lactona (4- hidroxí-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-ona) e seu peso molecular é de 154,12 u (Figura 1.2). Ela forma cristais incolores, tem ponto de fusão de 111°C, é solúvel em água, etanol, acetona, acetato de etila, éter e clorofórmio, mas é insolúvel em benzeno e éter de petróleo. A quantidade de patulina em suco de maçã é reduzida por estocagem prolongada, ação de sulfito e alta temperatura, adição de ácido ascórbico, fermentação alcoólica e tratamento com carvão ativo. A patulina perde sua atividade biológica em meio alcalino e em presença de moléculas contendo grupo sulfidríla, tais como cisteína e glutatona (CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS, 1998).

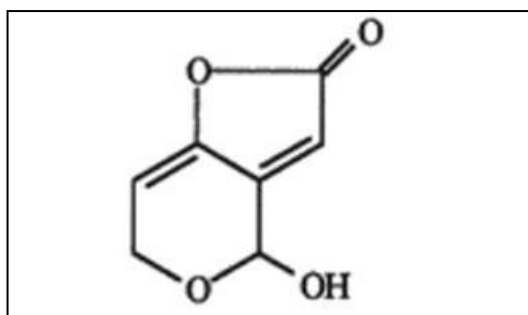


Figura 1.2: Estrutura química da patulina.
Fonte: Welke, 2009

Conforme descrito em Puel e Oswald (2010), a via biosintética da patulina consiste de 10 etapas e aproximadamente 15 enzimas incluindo a produção dos co-metabólitos (Figura 1.3). A primeira etapa de produção é a formação do ácido 6-metil salicílico (6MSA) a partir da condensação de uma molécula do acetil-CoA com 3 moléculas de malonil-CoA. Essa formação é catalisada pela enzima 6MSAS (ácido 6-metil salicílico sintase). A partir da formação do 6MSA será produzida uma substância intermediária denominada m-cresol, que por sua vez poderá formar o álcool m-hidroxibenzil (composto intermediário da via de síntese da patulina) ou toluíol (co-metabólito). O álcool m-hidroxibenzil originará o álcool gentisil e este por hidroxilação formará o gentisil aldeído ou filostina que a partir de reação reversível poderá ou não formar patulina na sequência de três etapas.

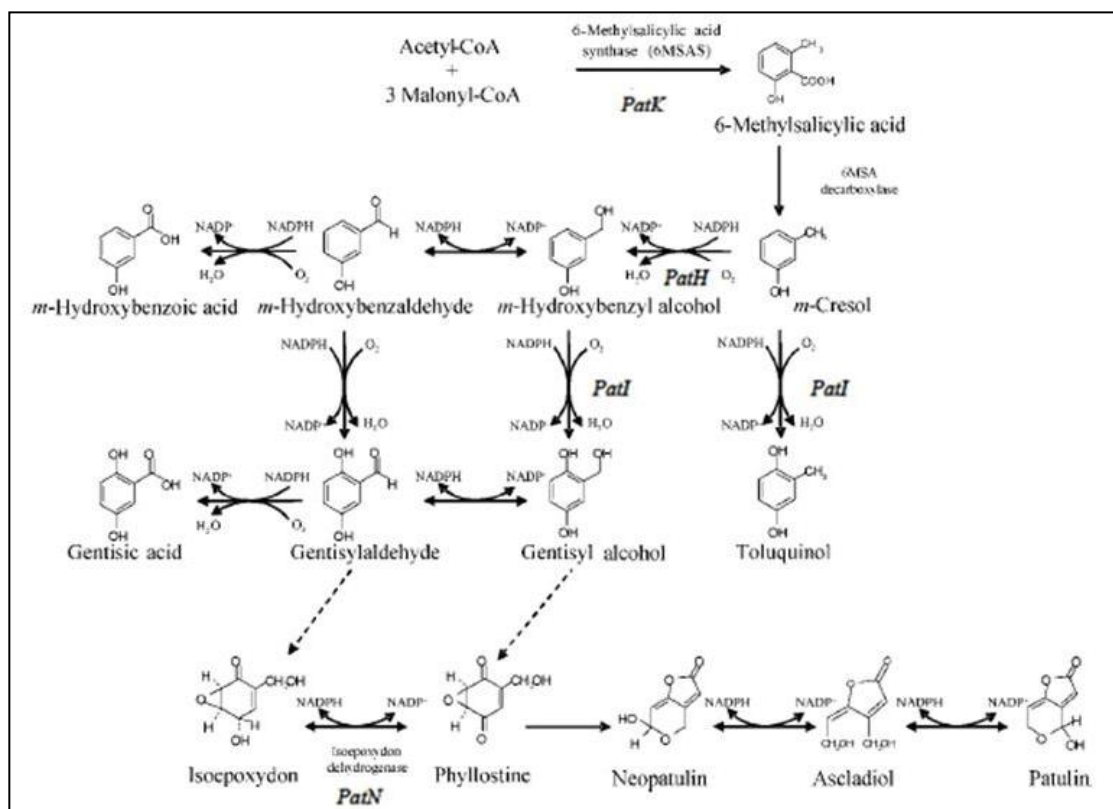


Figura 1.3 Esquema da via biossintética da patulina

Fonte: Puel e Oswald, 2010

Clinicamente a toxicidade da patulina tem-se manifestado sob a forma de: nervosismo, convulsões, congestionamento do pulmão, edema, hiperemia, distensão do tracto gastrointestinal, hemorragia intestinal e degeneração das células epiteliais, efeitos crônicos tais como genotoxicidade, neurotoxicidade, imunotoxicidade, imunossupressão, teratogênese e por último, mas não menos grave têm sido também atribuídos efeitos a nível celular sendo alguns exemplos destes efeitos a ruptura de membranas plasmáticas, a inibição da síntese de proteínas e a inibição da síntese de DNA e de RNA (MOAKE et al., 2005).

A toxicidade aguda para os roedores, a DL50 oral de patulina varia entre 29 e 55 mg/kg de peso corporal (pc) (MCKINLEY; CARLTON, 1980; MCKINLEY et al., 1982). Aves parecem menos sensíveis, com uma DL50 oral de 170 mg / kg de peso corporal. Quando administrado por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea, patulina é 3-6 vezes mais tóxica. Alguns compostos foram capazes de modular a toxicidade de patulina. Por exemplo, os inibidores do citocromo P450, tais como proadifen (SKF 525A) aumentam

consideravelmente a toxicidade desta micotoxina, enquanto que os indutores do citocromo P450 não modificam a sua toxicidade (HAYES ,1979).

Tanto espécies de fungos *Penicillium* como *Aspergillus* possuem a capacidade de crescimento a baixas temperaturas, mesmo quando existe o armazenamento das frutas, não sendo este fator físico impeditivo da produção de patulina, por sua vez, os fungos do gênero *Byssochlamys* são responsáveis pela produção de patulina em estados de pós-pasteurização, devido à sua capacidade de sobrevivência a tratamentos térmicos, aplicados aos derivados das frutas (SANT'ANA,et al., 2008).

A atividade de água exerce forte influência sobre o desenvolvimento dos microrganismos que causam degradação do alimento. Em geral, o valor ótimo de atividade de água para os fungos crescerem é diferente do valor ótimo da atividade de água em que o nível máximo de formação de micotoxinas é observado (DRUSCH; RAGAB, 2003). Segundo Magan e Olsen (2004) a faixa de temperatura para o crescimento e produção de patulina por *P.expansum* é 0-24°C e a atividade de água máxima de 0,99.

Segundo Northolt et al. (1978), Gaucher (1979) e Bullerman (1985) os principais fatores responsáveis pelo crescimento do *P. expansum* e a produção da micotoxina em frutas são a atividade de água superior a 0,82, a temperatura de 20 a 25°C e as diversas fontes de carbono: frutose, glicose, sacarose e ácido málico.

Baert et al. (2007) estudaram a influência das condições de armazenagem (temperatura e nível de O₂) no crescimento e na produção de patulina por diferentes cepas de *P. expansum* em um meio de cultura e em maçãs. O crescimento foi fortemente influenciado pela temperatura, enquanto que a atmosfera utilizada (20, 3, e 1% de O₂; < 1% CO₂) não teve efeito. O crescimento ótimo foi observado a 25°C para cada cepa testada. A produção de patulina foi estimulada quando houve diminuição da temperatura (de 20° para 10°C ou 4°C), enquanto uma redução ainda maior da temperatura para 1°C causou uma redução na produção de patulina. Uma diminuição clara da produção de patulina foi observada quando o nível de O₂ foi reduzida de 3 para 1%. Os resultados mostraram que a indução de estresse limitado ao fungo, tais como a diminuição da temperatura ou a redução dos níveis de O₂ estimulam a produção de patulina.

Estirpes fúngicas produtoras de patulina têm sido isoladas ao longo dos anos em diversos frutos e vegetais incluindo maçã, uva, cereja, pêra, morango, nectarina, framboesa, pêssego, ameixa, tomate, banana, amêndoa, amendoins e avelãs (MOAKE et al., 2005)

A produção de patulina pelo fungo ocorre nas partes danificadas da maçã, sendo que a intensidade de difusão dessa micotoxina é de 1cm em direção ao tecido sadio

(TANIWAKI et al., 1992). Entretanto, Rychlik e Schieberle (2001) encontraram patulina a 2cm além do tecido deteriorado de maçãs e 4 cm do tomate.

As entidades reguladoras, à luz das evidências, foram obrigadas a colocar avisos nos produtos alimentares contaminados por este composto. Na Europa e nos EUA a preocupação com esta problemática deu origem à implementação de níveis máximos para conteúdo de patulina em derivados de maçã (MOAKE et al., 2005).

A Organização Mundial da Saúde recomenda um nível máximo aceitável de 50µg/L de patulina em suco de maçã (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 1997). A União Européia adotou recentemente este mesmo limite e também 25µg/kg em produtos sólidos incluindo compota e purê de maçã. Além disso, o limite máximo de 10µg/kg é proposto para produtos de maçã destinados às crianças (THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2006). No Brasil, o limite máximo permitido para sucos e polpas de maçã é de 50µg/Kg (ANVISA, 2011).

Entre os vários métodos, simples ou mais sofisticados para a detecção da patulina, através de ensaios analíticos encontram-se a cromatografia em camada fina (TLC), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a cromatografia gasosa (GC) e a eletroforese capilar (CE). Dentre as técnicas analíticas, atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta (UV) ou fotodiodos (DAD) é o método mais utilizado na quantificação de patulina em derivados de fruta (SHEPHARD; LEGGOTT, 2000). Esta metodologia é a mais comumente utilizada no que diz respeito à determinação e quantificação de patulina, pois trata-se de um composto muito solúvel em água, relativamente polar e com um espectro de absorção característico (GÖKMEN et al., 2005).

Uma outra técnica foi desenvolvida, usando o método de CLAE com detecção por espectrometria de massa (MS). No método descrito a detecção baseia-se no princípio de dissociação induzida por colisão (CID) utilizando a pressão atmosférica e ionização química (APCI), com um limite de detecção descrito de 4 µg/L (SEWRAM et al., 2000).

Martins et al. (2002) verificaram a ocorrência simultânea de patulina e citrinina, micotoxinas produzidas principalmente por fungos *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., respectivamente, em 351 podridões de maçã de diferentes cultivares, utilizando Cromatografia em Camada Delgada para detecção e quantificação. O nível de detecção encontrado foi de 120-130 µg/kg para patulina e de 15-20 µg/kg para citrinina. Do total de amostras, 68,6% estavam contaminadas somente com patulina, 3,9% somente com citrinina e 19,6% contaminadas com patulina e citrinina simultaneamente.

Microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica relativamente simples do ponto de vista instrumental. Desenvolvida por Pawliszyn, sua forma original baseia-se na sorção

dos analitos por uma fibra de sílica modificada quimicamente, com posterior dessorção térmica dos analitos em um cromatógrafo a gás (LANÇAS, 2004).

Kataoka et al. (2009) utilizaram o método da microextração em fase sólida (SPME) acoplada a espectrometria de massa e cromatografia líquida para determinar a presença da patulina em sucos de fruta e amostras de frutas secas e verificou que o método mostrou-se bastante sensível para detecção da micotoxina. Embora existam outros métodos para analisar a presença de patulina, os autores escolheram esta técnica por ser um método no qual o processo de extração é automatizado, proporcionando uma redução de tempo, além de apresentar acurácia, precisão e melhor sensibilidade que outras técnicas, como por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia eletrocinética micelar por exemplo.

Atualmente os métodos que envolvem biologia molecular têm sido aplicados no estudo da detecção dos genes envolvidos na biossíntese da patulina. O uso da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tem atraído considerável atenção dos pesquisadores. Este método permite a detecção da presença de genes da via metabólica de síntese de qualquer substância tóxica em amostras de culturas puras dos fungos em estudo ou mesmo em alimentos contaminados com fungos toxigênicos.

Recentemente um grupamento de genes envolvidos na biossíntese da patulina foi isolado e apenas alguns genes relacionados à biossíntese de patulina foram identificados. O primeiro gene foi o ácido 6-methylsalicylic sintase gene (6MSAS) de *P. griseofulvum* (BECK et al., 1990; WANG et al., 1991). O gene que codifica a sétima enzima da via, a isoeopoxydon desidrogenase (IDH), foi isolado originalmente de *P. griseofulvum* (FEDESHKO, 1992), e depois de várias outras espécies de *Penicillium* (DOMBRINK-KURTZMAN, 2006; WHITE et al., 2006) e de *B. nivea* (DOMBRINK-KURTZMAN, 2006; PUEL et al., 2007) sendo denominado *idh*.

Finalmente, genes que codificam enzimas citocromo P-450 envolvidas em duas etapas da via de biossíntese de patulina, foram isolados de *Aspergillus clavatus*, e caracterizados por expressão heteróloga em leveduras (ARTIGOT, 2009).

Outro grupamento de 15 genes envolvidos na biossíntese de patulina foi identificado no genoma de *A. clavatus*. Todos os genes estão localizados em uma região de 40 kb (Figura 1.4). Os genes codificam enzimas necessárias para a biossíntese da toxina, bem como o fator regulador específico e transportadores. Este grupamento contém três genes transportadores: um transportador ABC (ligação a ATP), um transportador MFS (Superfamília dos Facilitadores Principais) e um transportador de acetato. O grupamento também contém genes para as enzimas: carboxil esterase (*PatB*), uma enzima álcool

desidrogenase Zn-dependente (*PatD*), uma GMC (Glicose -metanol-colina) oxidorreductase (*PatE*), um gene que codifica uma provável decarboxilase exibindo um domínio conservado com a amidohidroxilase amido conservada (*PatG*), dois genes (*PatH* e *PatI*) codificando citocromos P450 (responsável pela hidroxilação do m-cresol ao álcool m-hidroxibenzil e de álcool m-hidroxibenzil ao álcool gentisil, respectivamente) compostos intermediários da via de síntese de tolueno que é um co-metabólito da patulina, mas não um intermediário da via sintética desta micotoxina e um gene codificando a dioxigenase (*PatJ*) (ARTIGOT, 2009).

Neste mesmo grupamento de genes também estão presentes o gene *6msas* (*PatK*), um gene do fator de transcrição (*PatL*), o gene da desidrogenase isoeopoxydon (*PatN*) previamente isolado como gene *idh*, uma álcool isoamil oxidase descrita recentemente de *P. griseofulvum* (*PatO*) e, finalmente, um gene que não tem nenhuma função óbvia (*PatF*). Alguns grupamentos gênicos estão presentes no genoma de algumas espécies que não produzem patulina, tais como: *P. chrysogenum*, *Talaromyces stipitatus* e *Aspergillus terreus*. (Figura1.4)

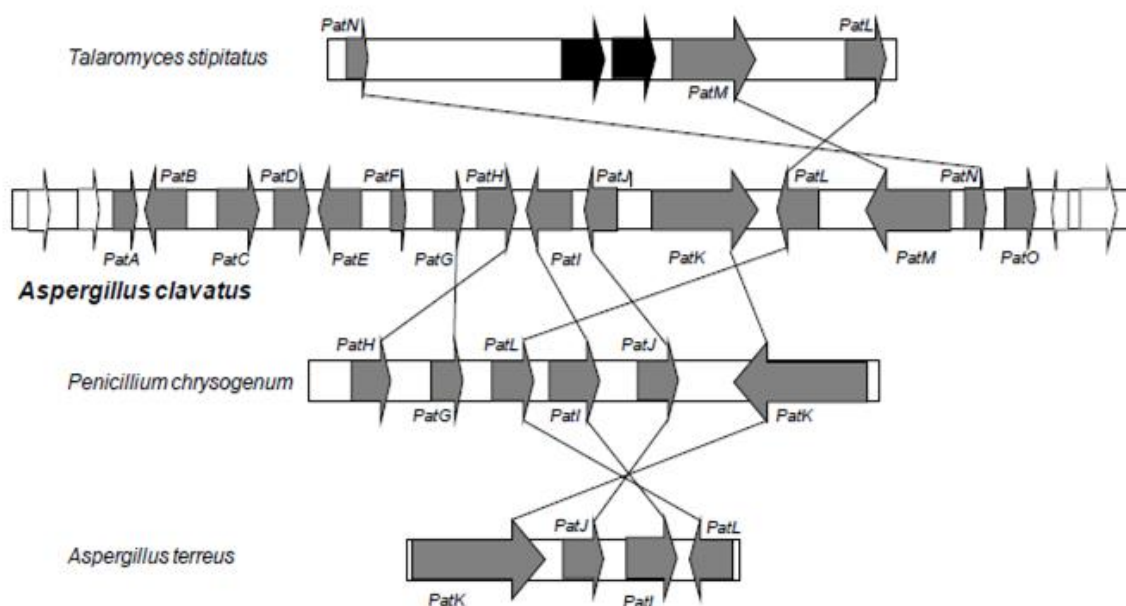


Figura 1.4. Grupamento de genes da via de síntese da patulina em *Aspergillus clavatus* e comparação com outros grupos de genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários de outras espécies fúngicas que apresentam alguns genes relacionados à produção da patulina (Fonte: Puel e Oswald, 2010). (Ver texto).

O fato destas últimas espécies não produzirem patulina pode ser explicado pela falta de alguns genes fundamentais, a exemplo do gene *6msas* em *T. stipitatus* ou gene *idh* em *A. terreus* ou *P. chrysogenum*. Apesar de Varga et al. (2005) confirmarem que *A. terreus* não é

uma espécie produtora de patulina, foi relatado previamente o isolamento do gene *AtX* que codifica a enzima 6MSAS. O gene codificou uma enzima funcional que levou à formação de 6MSA após expressão heteróloga em *A. oryzae* (FUJII,1996). Em *A. terreus*, outra via de biossíntese, do ácido terreico, precisa da atividade da ácido 6-metilsalicílico sintase (READ, 1969). Como ocorre apenas um gene *6msas* no genoma de *A. terreus*, é muito provável que este gene codifique uma enzima envolvida na biossíntese de ácido terreico nesta espécie.

Para a detecção da via metabólica da patulina pelas técnicas moleculares Paterson (2000) descreveu uma sequência de primers para o gene da enzima isoeopoxidon dehidrogenase (*idh*) da via metabólica de síntese para patulina de *Penicillium* sp. A partir do estudo deste gene foi possível detectar por PCR a presença de fungo toxicogênico em vários alimentos, principalmente de maçã e pêssego, concluindo que a identificação do gene *idh* é um recurso para triagem de controle para fungos toxicogênicos.

A detecção e identificação rápida de fungos filamentosos tem se tornado uma área importante dentro da micologia de alimentos visando ambos, o monitoramento do processo de produção e a identificação de fungos decompositores de alimentos. Desta forma, a detecção por PCR especialmente de fungos toxigênicos tem ampliado o número de espécies fúngicas estudadas, bem como de alimentos monitorados.

Pedersen et al. (1997) realizaram detecção de *P. roqueforti* e *P. carneum* em amostras de queijos comerciais utilizando primers da região ITS do DNA ribossomal específicos para as espécies do subgênero *Penicillium*, obtendo após amplificação fragmento de DNA de 336pb. Os autores pesquisaram o gene em 52 isolados de 28 espécies do subgênero *Penicillium* e identificaram regiões únicas para cada, individualmente, e para as espécies próximas dentro do subgênero.

Marek et al. (2003) desenvolveram um PCR para detecção de *P. expansum* utilizando primers específicos (PEF e PER) a partir de sequência interna conservada do gene (*Pepg1*) da enzima poligalacturonase (PKS), responsável pela necrose do tecido do fruto de maçã infectada. Os autores observaram amplificação da banda de DNA de 400pb em todos os isolados testados de *P. expansum* e não amplificação nas outras espécies de *Penicillium* comuns em alimentos, tais como: *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. solitum*, *P. notatum* e *P. commune*.

Konietzny e Greiner (2003) publicaram uma importante revisão sobre a aplicação da PCR na detecção de fungos toxigênicos em alimentos. Os autores enfatizaram que a detecção molecular auxilia a triagem de alimentos e derivados contaminados ao preceder a análise físico-química convencional das micotoxinas, uma vez que apenas as amostras positivas na detecção devem ser analisadas por CLAE ou outra metodologia disponível.

Sendo assim, a PCR convencional ou multiplex pode ser aplicada para selecionar alimentos de importância econômica para o mercado exportador para ausência de fungos produtores de micotoxinas ou após processamento. A PCR – multiplex é uma ferramenta de detecção que permite processar simultaneamente várias amostras para mais de uma micotoxina, utilizando pares de primers espécie específico numa mesma reação. Já existem primers para detecção de genes de vias metabólicas de síntese de várias micotoxinas, entre elas aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, ocratoxina e patulina.

Paterson (2004) relatou a presença de inibidores de PCR provenientes do próprio meio de cultura ao amplificarem o gene *idh* em amostras de culturas puras de fungo. Segundo os autores além dos inibidores já descritos tais como: ácido húmico, ácido fúlvico, a própria patulina produzida e secretada pelo fungo pode ser inibidor, já que a micotoxina possui capacidade de ligar-se a enzimas e ao próprio DNA. Sendo assim, para driblar a contaminação com inibidores de PCR foram realizadas diluições seriadas das amostras, e as amostras que eram inicialmente negativas no PCR tornaram-se consistentemente positivas após diluição. No entanto, algumas linhagens de *Penicillium* pertencentes as várias seções taxonômicas mantiveram-se negativas mesmo após diluição seriada de 10 a 1000x, indicando não possuírem o gene *idh* em seu genoma.

Paterson (2006) publicou revisão sobre a identificação e quantificação de fungos toxigênicos por PCR e observou que entre os artigos publicados até o momento não houve qualquer resultado incoerente que resultasse em PCR para o gene *idh* negativo com a detecção da patulina por CLAE positiva. Pois mesmo nas amostras inicialmente inconsistentes, ao repetir a PCR com nova amostra de DNA, o gene *idh* era amplificado em tal amostra.

Dombrink-Kurtzman (2006) observou diferenças entre as sequências do gene *idh* de *P. expansum* e *P. griseofulvum* que foram correlacionadas a quantidade de patulina que cada espécie pode produzir.

White et al. (2006) clonaram vários genes de *Penicillium expansum*, inclusive os genes *idh* e o gene da enzima ácido 6-metilsalicílico sintase (6-MSAS) de 470 pb. Além disso, ainda foi clonado um fragmento de 715 pb de um suposto gene transportador ligante de ATP, juntamente com parte de dois supostos genes do citocromo P450 monooxigenases P-450 1 e P-450 2. A expressão aumentada dos cinco genes foi observada em condições permissivas para síntese de patulina no meio de cultura, indicando pela primeira vez que a regulação na biossíntese de patulina em *P. expansum* é mediada ao nível transcricional do gene, sendo comum esse tipo de regulação em diferentes condições fisiológicas em fungos toxigênicos.

Puel et al. (2007) avaliaram o potencial de produção de patulina em 19 linhagens de duas espécies de *Byssoschlamys* relacionando com a detecção de dois genes envolvidos na via biossintética da patulina, a saber: *pks* codante da enzima policetídeo sintase e *idh* da enzima isoepoxidon desidrogenase. Os autores observaram que as oito linhagens de *B. nívea* apresentaram os dois genes e produziram patulina, enquanto nenhuma das 11 linhagens de *B. fulva* apresentaram os genes em estudo. Os autores concluíram que a ausência dos genes em *B. fulva* pode explicar a incapacidade de produção de patulina por essa espécie fúngica.

Paterson (2007) avaliou a especificidade da PCR usando o gene *idh* para associar a taxonomia de espécies fúngicas com produção de patulina. Foram estudadas 93 linhagens de várias espécies e os resultados mostraram que 17% das amostras analisadas apresentaram um padrão de banda única de 600pb compatível com espécies produtoras de patulina e amplicons com bandas múltiplas de 400 a 500pb foram encontrados em espécies não produtoras de patulina.

Elhariry et al. (2011) identificaram que entre 34 isolados de *Penicillium* oito foram provenientes de amostras de maçãs para fabricação de suco. Dezesete isolados foram identificados como sendo *P. expansum* (2 originários de maçãs aparentemente saudáveis e 12 de maçãs apodrecidas) utilizando-se primers para o gene da enzima PKS (poligalacturonase). O suco fabricado com partes saudáveis das maçãs apodrecidas apresentou patulina em análise por TLC (cromatografia de camada delgada). Desta forma, os autores enfatizaram a necessidade de maior rigor na seleção de maçãs para processamento, uma vez que a remoção de partes apodrecidas não elimina completamente a patulina do fruto.

A análise de microarranjos para regulação dos genes da biossíntese patulina e de outras micotoxinas foi desenvolvida por Schmidt-Heydt e Geisen (2007). Aplicação inicial deste microarray demonstra que ele pode ser usado para estudar a influência dos parâmetros de crescimento do fungo na regulação de genes e que pode ser utilizada para a detecção do mRNA de genes de biossíntese de micotoxinas no alimento. Esta abordagem oferece novas possibilidades para o estudo da influência de parâmetros ambientais, como substrato, temperatura, pH e atividade de água sobre a ativação dos genes da biossíntese de micotoxinas.

Capítulo 2

Detecção da micotoxina patulina em inhame com podridão-verde

Artigo a ser submetido ao International Journal of Food Microbiology

ISSN:0168-1605

Detecção da micotoxina patulina em inhame com podridão-verde

Marcela Clementino de Araujo^{a,b}, Cristian Fernando de Siqueira Alves^a, Romero Marinho de Moura^b, Emerson Peter da Silva Falcão^{c,d} Idjane Santana de Oliveira^b

^a Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco- Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão- PE- Brasil

^bLaboratório de Microbiologia e Imunologia , Universidade Federal de Pernambuco- Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão- PE- Brasil

^cLaboratório de Produtos Naturais Bioativos e Novos Fármacos - Universidade Federal de Pernambuco- Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão- PE- Brasil

^d Laboratório de Produtos Naturais - Departamento de Bioquímica Universidade Federal de Pernambuco Avenida Prof.Moraes Rego- S/N- Cidade Universitária- Recife-PE-Brasil

Autor para correspondência:

Profa. Idjane Santana de Oliveira

Email: idjaneoliveira@ yahoo.com

Universidade Federal de Pernambuco

Centro Acadêmico de Vitória – CAV

Rua Alto do reservatório, s/n

Vitória de Santo Antão – PE CEP. 55.608-680

Artigo a ser submetido à revista International Journal of Food Microbiology

ISSN: 0168-1605

Resumo

O inhame é uma cultura de importância econômica e social para a região nordeste do Brasil. A produção e exportação dessa *Dioscoreaceae* são igualmente afetadas por doenças e pragas no campo e armazenamento, especialmente pela “podridão-verde”, causada pelo fungo *Penicillium sclerotigenum*, microrganismo relacionado à produção da micotoxina patulina, um metabólito secundário. Diante deste fato, foi proposto um estudo de detecção do mencionado metabólito, em amostras de túberas comerciais de inhame da Costa, obtidas na Central de Abastecimento (CEASA). Foram obtidos 32 isolados de *Penicillium* e preservados por meio de três diferentes técnicas, os mesmos foram utilizados para inoculações artificiais de túberas sadias. Após o período de incubação, foram realizados ensaios moleculares por meio de PCR para detecção do gene *idh* da via de síntese da referida micotoxina, em três amostras de DNA, a saber: 1- isolado fúngico, 2- inhame naturalmente infectado e 3- inhame artificialmente infectado. Foi realizado ainda ensaio analítico por meio de CLAE nas referidas amostras. Os testes de PCR e CLAE foram positivo independente dos três de tipos de amostras utilizadas, em 65,6% indicando relação entre presença do gene *idh* no fungo ou inhame infectado, com produção da patulina. A metodologia de PCR para detecção do gene *idh* em inhame infectado mostrou-se sensível (10 a 30ng de DNA total incluindo o DNA do fungo), reprodutível (obtenção de mesmo resultado em diferentes reações de PCR para as mesmas amostras) e específico para detecção de espécies toxigênicas em inhame, por ter sido positivo apenas para *P. sclerotigenum* e negativo para outras espécies de *Penicillium* que infectam o inhame e que até o momento não foram registradas no Brasil.

Palavras-Chave: *Penicillium*, túbera, toxina, PCR, CLAE, gene *idh*.

Abstract

The yam is crop of high economic and social value to the populations living in the northeast of Brazil. The production and exportation of this *Dioscoreaceae* are directly affected by diseases and parasites, especially the "green-rot", caused by the fungus *Penicillium sclerotigenum* microorganism related to the production of the mycotoxin patulina, a secondary metabolite. Considering this fact, it was proposed a study on detection of the mentioned mycotoxin in samples of yam tubers of the variety da Costa, collected in Central Market (CEASA). After obtaining the purified fungus isolates, they were preserved by means of three different techniques. After that, health yam tubers under aseptic conditions were

artificially inoculated. After the incubation period, molecular tests were performed using PCR test for the gene *idh* present in pathway of synthesis of the patulin in three samples of DNA, as follows: 1-fungal isolate, 2- yams naturally infected and 3- artificially inoculated. Test was also carried out by analytical HPLC in these samples. The PCR test and HPLC were positive in all three type independent of samples used in the experiments in 65%, indicating relationships between the presence *idh* gene in the fungus or infected yam tubers and production of patulin. The PCR methodology for detection of gene *idh* in yam infected (naturally and artificially) with *P. sclerotigenum* was sensitive (10 to 30ng of total DNA including the DNA of the fungus), reproducible (obtaining the same result in different PCR reactions for the same samples) and specific for detection of *Penicillium* mycotoxigenic species in yam, for being only positive for *P.sclerotigenum* and negative for other *Penicillium* species that infect yam so far not reported in Brazil.

Keywords: *Penicillium*, tuber, toxin, PCR, HPLC, gene *idh*.

1. Introdução

A cultura do inhame alcança no Nordeste brasileiro grande importância sócio-econômica, e suas túberas poderão contribuir na solução do problema da demanda reprimida de alimentos, como também na geração de emprego e renda aos pequenos produtores (Santos, 2002). Os dois tipos de inhame mais usados na alimentação no Brasil são comercializados nas Centrais de Abastecimento (CEASA), feiras livres e supermercados, com carregamentos oriundos dos estados produtores, em função das épocas de produção. Os exportadores possuem infra-estrutura própria, diferenciada, para ações de “packing house” que envolvem a seleção, tratamento fitossanitário, embalagem e armazenamento.

Entre os problemas fitossanitários mais importantes que podem restringir sobretudo o comércio exportador do inhame da Costa, encontra-se a podridão-verde, doença do tipo pós-colheita, de alta severidade, que incide sobre túberas comerciais e sementes do inhames da Costa (*Dioscorea cayenensis*) cujo agente etiológico é *Penicillium sclerotigenum* (Moura, 2005).

Em geral, o primeiro sintoma perceptivo da podridão-verde do inhame é uma pequena mancha úmida, sempre associada a fermento na túbera. Nessa fase o patógeno já penetrou e encontra-se colonizando os tecidos internos, originando uma lesão profunda, úmida, de coloração marrom (Moura,1976). Cortando-se transversalmente túberas com os

100 sintomas descritos da periferia para a parte interna, verifica-se necrose dos tecidos, com
101 aspecto de podridão úmida, de coloração marrom, que se estende a alguns centímetros do
102 raio da lesão, semelhante ao observado em meio de cultura, quando do isolamento do
103 fungo. A podridão evolui rapidamente e em pouco tempo toda a túbera fica comprometida,
104 tornando-se imprestável para o consumo humano (Santos,1996). A fase de reprodução do
105 patógeno tem início com o aparecimento sobre a lesão de uma camada de cor verde,
106 formada por conidióforos e conídios. Mais tarde, ao iniciar a saprogênese, *P. sclerotigenum*

107 *Penicillium sclerotigenum* foi descrito no Japão (Yamamoto et al., 1955) causando podridão
108 em túberas de inhame chinês (*Dioscorea batatas* Dec.). Moura et al. (1976) fizeram
109 descrição morfológica de *P. sclerotigenum* em Pernambuco, Brasil.

110 Frisvad e Samson (2004) durante a revisão de *Penicillium* subg. *Penicillium* levando em
111 consideração as características morfofisiológicas, nutricionais e moleculares agruparam *P.*
112 *sclerotigenum* na série *Expansa*, formada pelas espécies *P. expansum* e *P. marinum*
113 Frisvad e Samson. Nesta série as espécies apresentam conidióforos bi ou triverticilados,
114 conídios subglobosos, ramos longos com parede lisa, ocasionalmente rugoso em meio de
115 cultura MEA (extrato de malte agar). As três espécies da série *Expansa* apresentam
116 colônias com aparência gerais semelhantes e produção de patulina, roquefortina C e
117 geosmina.

118 Dentre as espécies do subgênero *Penicillium* que já foram assinaladas associadas à
119 podridão em inhame, *P. sclerotigenum* destaca-se por ser a mais freqüente e virulenta no
120 mundo (Okigbo, 2004). Outras espécies de *Penicillium* foram identificadas na Nigéria como
121 agentes etiológicos de podridões em inhame, mas ainda não foram assinaladas no Brasil
122 sendo essas: *P. chrysogenum* Thom, *P. expansum* (Link) Thom, *P. italicum* Wehmer e *P.*
123 *oxalicum* (Okigbo, 2004).

124 Por se tratar de uma espécie do gênero *Penicillium*, gênero reconhecidamente produtor de
125 antibióticos, possivelmente algum metabólito secundário com atividade antimicrobiana
126 poderia ser isolado de *P. sclerotigenum*, sendo esta indicação confirmada com o trabalho de
127 Clarke e Mckenzie (1967). Esses autores identificaram a produção de griseofulvina em
128 extratos de micélio de isolados de *P. sclerotigenum*, após bioensaio com *Botrytis allii* Munn.
129 Outras espécies de *Penicillium* também produzem griseofulvina, sendo a principal *P.*
130 *griseofulvum* Dierckx.

131 Outras substâncias de importância médica, além dos antibióticos, e produzidas por várias
132 espécies do gênero *Penicillium*, são as micotoxinas. Estas são produtos naturais de baixo

133 peso molecular, produzidas como um dos metabólitos secundários durante o crescimento de
134 fungos filamentosos. Dentre as várias micotoxinas identificadas e que apresentam efeitos
135 tóxicos para homens e animais, a patulina é a mais importante sendo produzida, não
136 exclusivamente, por *P. sclerotigenum* (Frisvad et al., 2004).

137 A patulina foi isolada na década de 40 a partir de *P. patulum* Bainier (*P. griseofulvum*),
138 sendo produzida por mais de 60 espécies de fungos distribuídos em 30 gêneros (Moake et
139 al., 2005). Durante a década de 50 foi comprovado que a patulina, além de apresentar
140 atividade antimicrobiana, antiviral e antiprotzoária, também era tóxica a plantas e animais,
141 sendo classificada em 1960 como micotoxina. Hoje, *P. expansum* Link, que causa podridão
142 em maçã, pêra, cereja e outras frutas, é reconhecidamente uma das espécies que produz
143 patulina mais comuns de *Penicillium* (Benett e Klich, 2003). Nos animais a patulina possui
144 efeito hepatotóxico, afeta rins, baço e cérebro. No homem, apresenta provavelmente ação
145 carcinogênica, mutagênica, teratogênica e fetotóxica (Gonzalez et al., 2001). Patulina é
146 comum em sucos de frutas (especialmente maçã e pêssego) (Andersen et al., 2004), uva
147 (Abrunhosa et al. 2001), entre outros alimentos.

148 *Penicillium sclerotigenum* é reconhecido como produtor não apenas de patulina, mas
149 também de roquefortina C e D, moléculas que, originadas de triptofano, histidina e terpeno
150 (DMA-dimetilil), apresentam potencial farmacêutico com atividade antibiótica e podem ser
151 neurotóxicas (Frisvad e Filtenborg, 1990). Além da produção de patulina e roquefortina C e
152 D, *P. sclerotigenum* ainda produz gregatinas, moléculas consideradas fitotoxinas e com
153 potencial ação antibiótica (Samson et al., 2004), todas essas substâncias sendo produzidas
154 em meio de cultura, não sendo descrita ainda detecção no inhame.

155 Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi detectar em inhames com podridão-verde a
156 presença do gene *idh* por PCR e da micotoxina patulina por CLAE.

159 2. Material e Métodos

161 2.1 Isolamento e Preservação

162 As túberas de inhame com sintomas de podridão-verde e, portanto, naturalmente infectadas
163 com *Penicillium* spp. foram coletadas de feiras livres e na Central de Abastecimento de
164 Pernambuco e utilizadas para isolamento do fungo e extração da patulina, a partir de
165 fragmentos da região da lesão. Para desinfecção superficial com finalidade de obter
166 culturas puras de *P. sclerotigenum* utilizou-se álcool etílico 50% e hipoclorito de sódio 2%
167 diluído 1:3. Em seguida, os fragmentos foram lavados em água destilada estéril e
168 plaqueados em meio de cultura CYA [Czapek Yeast Autolysate – NaNO₃ (0,3%), extrato de

levedura – Difco (0,5%), sacarose (3,0%), $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (0,13%), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,05%), KCl (0,05%), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,001%), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,0005%), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,001%), Agar (1,5%)] e incubados por 5 dias. A identificação da espécie de *Penicillium* seguiu metodologia estabelecida por Frisvad e Samson (2004), utilizando-se características macroscópicas (crescimento nos meios de cultura CYA, MEA [Blakeslee Malt Extract Autolysate - extrato de malte (3,0%), peptona (0,1%), glicose (2,0%), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,0005%), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,001%), Agar (2,0%)] e YES (Yeast Extract Sucrose – extrato de levedura (2,0%), sacarose (15,0%), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,05%), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,0005%), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,001%), Agar (2,0%)] e microscópicas, bem como a principal característica da espécie do subgênero *Penicillium*, produção de estrutura de resistência esclerócio. Todos os isolados foram preservados em subculturas periódicas, em tubos de ensaio contendo meio CYA, em óleo mineral esterilizado, à temperatura ambiente e, também, em água destilada esterilizada, à 4°C (Figueiredo, 2001).

2.2 Coleção de Culturas de *Penicillium* sp.

Isolados de outras espécies de *Penicillium* e uma de *Aspergillus* foram utilizadas nos ensaios de PCR e cedidas pela Coleção de Culturas URM – UFPE – Recife, a saber: *P. expansum* Link (331 URM), *P. chrysogenum* Thom (3754 URM), *P. oxalicum* Currie & Thom (4254 URM) e *Aspergillus niger* (4709 URM). Todas essas espécies já foram citadas na literatura como possíveis causadores de podridão-verde em inhame.

2.3 Infecção Artificial de Inhame com *Penicillium sclerotigenum*

As túberas de inhame foram lavadas e desinfetadas com hipoclorito de sódio diluído 1:3 por 1min. Em seguida, foram seccionadas e secas a temperatura ambiente e inoculadas com discos de micélio dos isolados de *P. sclerotigenum* cultivados em meio CYA por sete dias. Cada rodela inoculada foi acondicionada em câmara úmida por 20 dias para o desenvolvimento da podridão-verde (Menezes e Assis, 2004).

2.4 Extração de DNA

Para obtenção da massa micelial com finalidade de extração de DNA genômico dos fungos, seja a partir de culturas puras ou de inhame naturalmente ou artificialmente infectados, foi realizado cultivo em meio líquido CY (mesma composição do meio CYA, sem o Agar), durante seis dias a temperatura de 28°C e processados conforme descrito em Oliveira et al. (2007), separando-se a massa micelial do meio CY por meio de filtração em papel de filtro esterilizado e em seguida retirando-se o excesso de água do micélio ao prensar o mesmo

entre folhas de papel de filtro. Em seguida, o micélio foi congelado e preservado à -20°C até o processamento de todas as amostras. Para extração de DNA das amostras de culturas puras do fungo e amostras de inhame natural ou artificialmente infectado pelo fungo. Os métodos testados foram: Raeder e Broda (1985), que utilizou fenol/clorofórmio/álcool isoamílico/etanol e o método Asemota (1995) utilizando-se mercaptoetanol/ acetato de potássio/ isopropanol. Os DNAs extraídos foram separados em gel de agarose a 1% corados com syber safe (Invitrogen, BR) e visualizados em transiluminador de luz azul (Invitrogen, BR).

2.5 PCR (Reação de Cadeia de Polimerase)

A amplificação do gene *idh* da enzima chave da via de síntese da patulina, isoeopoxidon desidrogenase, foi realizada utilizando-se os primers IDH1 e IDH2, cujas seqüências são respectivamente, 5' - CAA TGT GTC GTA CTG TGC CC -3', e 5' - ACC TTC AGT CGC TGT TCC TC - 3', gerando um produto de amplificação de 600 pb (Paterson et al., 2003). O Mix da PCR utilizado para volume final de reação de 25µL foi: 0,2µM de mix de dNTPs, 0,5 µM de cada primer (IDH 1 e IDH2), 1,5mM de MgCl₂, 1x do Tampão da enzima e 0,5U de Taq polimerase e aproximadamente 10 - 30 ng de amostra de DNA. Para a otimização da PCR foi realizada curva de primer (0,1µM a 0,5 µM). A amplificação do gene *idh* ocorreu no termociclador Biocycler MJ96G nas seguintes condições: 94°C por 1 min, 52°C por 45 s, 72°C por 1 min por 30 ciclos (Paterson et al., 2003). Este processo ocorreu precedido de um passo inicial de desnaturação de 94°C por 3 min e finalizado com extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com syber safe e observados em transiluminador de luz azul.

2.6 Extração da patulina e análise por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

A patulina foi extraída de todas as amostras utilizando-se clorofórmio, a partir de adaptação do protocolo descrito por Svendsen e Frisvad (1994). As amostras extraídas foram: isolados de *P. sclerotigenum* e inhames naturalmente e artificialmente infectados com esse fungo. O processo de extração da patulina nos isolados do fungo foi realizado utilizando-se 1g de micélio de culturas crescidas em meio líquido YES. Para a extração de inhame infectado foi retirado pequeno fragmento do local da lesão (1g). Após maceração em cadinho, as amostras do fungo ou do inhame foram, colocados em erlenmyers contendo 50mL de clorofórmio e mantidos a 0°C por 24h com agitação manual em intervalos irregulares. Em seguida, as amostras foram filtradas com papel de filtro para obtenção do extrato e o volume

de clorofórmio foi evaporado em capela de exaustão de gases e em seguida o extrato foi transferido para frascos de vidro. Os extratos obtidos foram filtrados em membrana de 0,22µm e injetados (10µL) no CLAE (Shimatzu, coluna de 25/C18 NST C-18 250 mm x 4,6 mm; fase móvel acetonitrila:água 95:5 v/v; taxa de fluxo 1 ml/min; comprimento de onda 275 nm). Foi utilizada como amostra padrão a patulina (Sigma) preparada em metanol na concentração de 1mg/ml a partir da qual foi feita a curva de calibração com concentração variando entre 62,5 µg/ml até 1mg/ml. Foram consideradas positivas todas as amostras que apresentaram pico (área) próximas ao tempo de retenção do padrão de patulina.

3.0 Resultados e Discussão

3.1 Isolamento fúngico

A partir das amostras de túberas de inhame da Costa e São Tomé com sintomas de podridão-verde (Figura 2.1A), coletadas e oriundas de diferentes Estados brasileiros, foi obtido um total de 32 isolados de *Penicillium* sp. Os dados macroscópicos e microscópicos obtidos confirmaram a identificação dos isolados como pertencentes à espécie *P. sclerotigenum*. Os isolados de *P. sclerotigenum* nos meios de cultura CYA, MEA e YES cresceram com diâmetro da colônia acima de 40mm, aos sete dias a 25°C (Figura 2.1C), conforme estabelecido por Frisvad e Samson (2004) para identificação da espécie. A maioria dos isolados produziu pigmento marrom solúvel, quando em meio CYA. A produção de esclerócios ocorreu em todos os isolados nos meios MEA e CYA, sendo mais intensa nas culturas contendo meio CYA inclinado (Figura 2.1E) do que em placa de Petri. Esta característica é importante diferenciadora da espécie *P. expansum* (Figura 2.1E). Oliveira (2005) observou variabilidade das colônias de *P. sclerotigenum* em meio CYA e classificou quatro grupos morfológicos distintos, com base na aparência das colônias, (grupo I, colônias de micélio com textura aveludada verde cinza azulada, com pequena área sub marginal clara, reverso marrom oliva; grupo morfológico II micélio nas mesmas colorações de frente e reverso que o grupo I, porém com textura floculosa; grupo III apresentou micélio floculoso, com pouca área central verde, e extensa área sub marginal clara; grupo morfológico IV possuíam micélio com cor e textura semelhantes ao grupo I, porém apresentou ainda estrias radiais, partindo do centro da colônia, e áreas sub marginais claras e concêntricas), sem correlação com atividade enzimática do micélio ou mesmo origem de isolamento dos fungos. Todos os grupos morfológicos apresentaram intensa produção de esclerócios. Dentre os 32 isolados estudados nesse trabalho, o grupo morfológico I e III foram os mais freqüentes, corroborando com os dados encontrados por Oliveira (2005) que observou maior

freqüência também do grupo I, sendo possuidor das características típicas das colônias de *P. sclerotigenum* em CYA, segundo descreveram Frisvad e Samson (2004). Neste grupo, ficaram os isolados cujas colônias apresentaram micélio com textura aveludada nos meios CYA e MEA, cor verde cinza azulada, com pequena área sub marginal clara, reverso cor marrom oliva. O grupo III apresentou micélio floculoso, com pouca área central verde, e extensa área sub marginal clara. Essa variabilidade morfológica com quatro grupos distintos que foi descrita por Oliveira (2005) para *P. sclerotigenum*, ressalta, em importância, por ser essa espécie pertencente a mesma série *Expansa*, subgênero *Penicillium* da qual faz parte também *P. expansum*, cuja variabilidade morfológica já foi descrita (Berny e Hennebert, 1985).

As culturas puras dos 32 isolados de *P. sclerotigenum* apresentaram em meio MEA micélio densamente entrelaçado, com conidióforos bi e triverticilados assimétricos, com predominância do primeiro (Figura 2.1D); ramos lisos e rugosos, predominando o segundo tipo; conídios em cadeia, com superfície lisa, formando pequenos pincéis, típicos do gênero, duas a cinco metulas com uma a seis fiáides; esclerócios gregários ou algumas vezes isolados, globosos ou elipsóides, castanhos a marrom escuro.

A distribuição geográfica dos isolados de *P. sclerotigenum* dentre os 32 obtidos foi: 27 (87,5%) a partir de *Dioscorea cayennensis* (inhame da Costa) provenientes dos estados de PE (24), São Paulo (1), Distrito Federal (1), Rio Grande do Norte (1); 4 (12,5%) isolados de *D. alata* (inhame São Tomé) oriundos de Rondônia (1), Maranhão (2) e Mato Grosso (2). Cada isolado recebeu a sigla do estado de origem.

É importante a determinação da distribuição de *P. sclerotigenum* no Brasil, pois, além das perdas naturais impostas à cultura do inhame, esse patógeno também pode causar podridão em outras culturas, a exemplo de maçã, pêra e banana, conforme demonstraram em infecção artificial Oliveira et al. (2006).

3.2 Preservação das culturas e Coleção de Culturas de *Penicillium* sp

A preservação dos isolados de *P. sclerotigenum* e das outras espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* provenientes da coleção de culturas URM foi realizada por três métodos comumente utilizados em micologia, a saber: subculturas periódicas, em tubos de ensaio contendo meio CYA, coberto com óleo mineral esterilizado, à temperatura ambiente e, também, em água destilada esterilizada, à 4°C. No entanto, Santos et al. (2002) avaliaram a influência de vários métodos (subcultura periódica, óleo mineral, manutenção a 4°C, sílica gel e liofilização) e meios de cultura (YES e agar suco de uva) na preservação de *P. expansum* frente a produção das micotoxinas patulina e citrinina. Os autores observaram

que a produção de citrinina foi estável após 12 meses de preservação independente do método de preservação e meio de cultura utilizado. Enquanto que a produção de patulina foi influenciada pelo meio de cultura e método de preservação. O método de preservação que manteve a estabilidade de produção de patulina pelos isolados foi a liofilização e o meio de cultura Agar suco de uva. Após 12 meses a produção da patulina não foi detectada nos 10 isolados preservados em óleo mineral independente do meio de cultura. No entanto, considerando que todos os 32 isolados de *P. sclerotigenum* serão depositados na Coleção de Culturas Fúngicas (Micoteca) do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, cadastrada no CMI (Commonwealth Mycological Institute, Inglaterra) com a sigla URM (University Recife Mycology), fica assegurada a preservação por liofilização.

3.3 Extração de DNA e PCR em *Penicillium sclerotigenum* e inhame com podridão-verde

Foram testados inicialmente dois protocolos de extração de DNA total do fungo a partir de culturas puras e inhame infectado, seja naturalmente ou artificialmente. O rendimento médio obtido nas extrações de DNA de isolados do fungo pelo método de Asemota (1995) foi de 10 ng/μL com variação de 5 a 20 ng/μL e pelo método de Raeder e Broda (1985) foi em média de 15 ng/μL com variação de 10 a 30 ng/μL. Para a extração de DNA de *P. sclerotigenum* presente no inhame infectado houve um rendimento menor para ambos os métodos de extração. Ainda assim, tanto na extração de isolados fúngicos, quanto de inhame infectado, o DNA obtido pelo método de Asemota (1995) estava mais íntegro embora em menor quantidade e com alto peso molecular. Foram extraídos DNAs genômicos de outras espécies de *Penicillium* e o resultado foi semelhante ao encontrado para a extração de isolados fúngicos.

A amplificação do gene *idh* foi realizada em duplicatas e em momentos diferentes, processo que foi utilizado para testar a reprodutibilidade do ensaio e evitar falsos negativos. Foi realizada ainda uma curva de primer com concentrações variando de 0,1 a 0,5μM e observou-se que a partir de 0,2 μM houve amplificação do gene *idh*.

Foram obtidas amplificações a partir de 10ng de DNA não purificado para 25μL de reação em ambas as amostras, de forma que fixou-se um intervalo entre 10 e 30ng, embora amplificações tenham ocorrido com 50ng de DNA total. Paterson et al. (2003) utilizaram 50 a 100ng de DNA purificado de culturas puras de *P. roqueforti* e *P. expansum* para detecção do gene *idh*.

Nesse trabalho foram utilizadas amostras de DNA do fungo e de inhame sem prévia purificação e em menor quantidade diminuindo a possibilidade de existência de inibidores da

PCR. Paterson (2004) relatou a presença de inibidores de PCR provenientes do próprio meio de cultura ao amplificarem o gene *idh* em amostras de culturas puras de *P. expansum*. Segundo os autores além dos inibidores já descritos tais como: ácido húmico, ácido fúlvico, a própria patulina produzida e secretada pelo fungo pode ser inibidor, já que a micotoxina possui capacidade de ligar-se a enzimas e ao próprio DNA. Sendo assim, para minimizar a contaminação com inibidores de PCR foram realizadas diluições seriadas das amostras, as quais inicialmente eram negativas no PCR e após diluição tornaram-se consistentemente positivas. No entanto, algumas linhagens de *Penicillium* pertencentes as várias Seções taxonômicas do subgênero *Penicillium* mantiveram-se negativas mesmo após diluição seriada de 10 a 1000x, indicando não possuírem o gene *idh* em seu genoma (PATERSON, 2004).

Houve amplificação do gene *idh* por meio do DNA obtido por ambos os métodos de extração quando este DNA foi originário de isolados fúngicos, contudo o método de Raeder e Broda (1985) mostrou-se ineficiente para a amplificação do gene quando o DNA obtido foi de *P. sclerotigenum* em infecção natural e artificial no inhame, possivelmente por permitir a remanescência de inibidores diversos de amplificação. Já o DNA obtido pelo método de Asemota (1995) possibilitou a amplificação do gene tanto de culturas puras do fungo quanto de inhame infectados natural e artificialmente (Figura 2.2 A e 2.2B).

O protocolo de Asemota (1995) mostrou-se eficiente principalmente porque as amostras de DNA após extração foram usadas diretamente na PCR e amplificaram sem prévia etapa de purificação, tanto para o DNA de fungo quanto inhame com podridão-verde. Esses resultados são inéditos na detecção de fungo toxigênico (*P. sclerotigenum* usando o gene *idh*) em inhame, uma vez que todos os alimentos analisados até o momento pela PCR foram frutas e sucos industrializados.

O resultado da PCR de outras espécies de fungo que já foram descritas na literatura causando podridão em inhame, mas que não ocorrem no Brasil e nem produzem patulina, com exceção de *P. expansum*, mostrou que as espécies *P. chrysogenum*, *A. niger*, *P. oxalicum* e *P. citrinum* não apresentaram o gene da patulina em seu genoma, corroborando com os resultados encontrados para estas espécies por Paterson et al. (2007). (Figura 2.3)

Dentre os 32 isolados de *P. sclerotigenum* avaliados para a presença do gene *idh*, 24(75%) apresentaram-se positivos com banda única de 600pb. E quando a detecção foi no inhame artificialmente infectado com os mesmos 32 isolados a detecção aumentou para 29 (90,75%) de positividade. Esses resultados mostraram a aplicabilidade da PCR para a triagem de *P. sclerotigenum* toxigênico e corroboraram com os dados de Paterson et al. (2007) que ao avaliar a especificidade da PCR usando o gene *idh* para associar a taxonomia

de espécies fúngicas com produção de patulina, encontrou 92,3% (24) de positividade para isolados de *P. expansum* e 17% (26) de positividade dentre as 93 linhagens de várias espécies do subgênero *Penicillium*, todas com padrão de banda única de 600pb compatível com espécies produtoras de patulina. Amplicons com bandas múltiplas de 400 a 500pb foram encontrados em espécies não produtoras de patulina dentro dos gêneros *Aspergillus* e *Byssoschlamys*.

Para as 22 amostras de DNA de inhame naturalmente infectado com *P. sclerotigenum*, a positividade da PCR foi menor 9 (40,9%) quando comparada à infecção artificial 29 (90,75%), possivelmente devido a diminuição da presença do fungo (micélio) com o tempo de infecção e por não se ter essa informação no momento da coleta da túbera. Além disso, existem os microrganismos inibidores naturais aderidos ao solo da túbera competindo com *P. sclerotigenum* (Okigbo, 2004).

A menor sensibilidade da PCR em detectar amostras positivas em inhame naturalmente infectado pode ainda estar associada à inibição da PCR pela presença de substâncias presentes no tecido vegetal ou mesmo pela presença excessiva da patulina no local da lesão do inhame, pois fragmentos do mesmo local da podridão do inhame foram utilizados para a extração de DNA e para a extração de patulina. Essa possibilidade pode explicar o resultado negativo na PCR do isolado PE08 (tabela 1) e a maior contaminação com patulina em inhame (5,5mg/g de inhame - lesão) ter sido encontrada na amostra naturalmente infectada (PE08) (dados não mostrados). Além disso, a toxicidade da patulina está relacionada a habilidade em alquilar várias enzimas e inibir a transcrição por ligação direta com o DNA, sugerindo afetar a PCR, segundo Paterson (2004).

Konietzny e Greiner (2003) publicaram uma importante revisão sobre a aplicação da PCR na detecção de fungos toxigênicos em alimentos. Os autores enfatizaram que a detecção molecular auxilia a triagem de alimentos e derivados contaminados ao preceder a análise físico-química convencional das micotoxinas, uma vez que as amostras positivas na detecção devem ser analisadas por CLAE ou outra metodologia disponível. Sendo assim, a PCR convencional ou multiplex pode ser aplicada para selecionar alimentos de importância econômica para o mercado exportador para ausência de fungos produtores de micotoxinas ou após processamento.

3.4 Extração da Patulina e CLAE de inhame com podridão-verde

Diante dos limites legais do Brasil para concentração de patulina em alimentos que é de 50µg/Kg (ANVISA, 2011) bem com tomando-se como referência para todos os estudos realizados com maçã e derivados, os limites estabelecidos pelos países pertencentes à

União Européia que são de 10µg/kg para alimentos para infantis e de 50µg/kg para sucos e derivados de maçãs para alimentação adulta (Celli et al. 2009).

Tanto para isolados fungicos quanto para inhame o clorofórmio extraiu mais patulina do que o metanol. O tempo de retenção da patulina da amostra padrão foi de 9,8 min. As amostras avaliadas foram consideradas positivas a partir da presença de pico (área) e tempo de retenção comparados ao padrão.

A detecção qualitativa de patulina em inhame realizada neste trabalho, tanto em amostras naturalmente infectadas ou artificialmente, restringiu-se à área com presença sintomatológica de podridão-verde (presença de micélio do fungo e tecido de coloração marrom no inhame). Não foi avaliada nesse trabalho a dispersão da patulina em inhame, além do local da lesão. A capacidade de difusão da patulina para além da área de tecido infectado tem sido relatada em maçãs (Taniwaki et al., 1992; Rychilik e Schieberle, 2001), e tomates (Rychilik e Schieberle, 2001), o que tem mostrado que o coeficiente de difusão da patulina é maior quanto maior o teor de água. Em maçãs onde o teor de água é de 84% a patulina difunde-se 1cm (Taniwaki et al., 1992) a 2cm (Rychilik e Schieberle, 2001) por entre o tecido sadio, já em tomates onde o teor de água é de 95% a patulina difunde-se por todo o tomate. A partir de tais dados e tomando como referência o teor de água em inhame que é de 73% (Santos, 2002), sugere-se que a difusão da patulina em inhame seja menor que 2cm para além do tecido com características sintomatológicas de podridão-verde. Marin et al., (2006) avaliaram o grau de contaminação por patulina em maçãs infectadas com *P. expansum* e armazenadas a temperatura ambiente por 5 dias e sua relação com a cultivar, grau de maturação, tamanho das lesões e capacidade de difusão no tecido sadio. A difusão da patulina ocorreu quanto maior foi o tamanho da lesão, chegando a 4cm, mas concentrada num diâmetro de 1,5cm da lesão. Os autores sugeriram que a remoção do tecido afetado e tecido sadio próximo é uma prática razoável de prevenção de toxina em derivados de maçã.

Um hábito, em geral, comum dos consumidores ao comprarem inhame com podridão-verde é cortar a parte ruim (externamente de cor verde e internamente de cor marrom), método físico de remoção de micotoxinas do alimento a ser consumido, e cozinhar a polpa branca. Com base nas informações supracitadas acerca da difusão da patulina em inhame, sugere-se que o corte para remoção física da patulina seja realizado acima de 2 cm além da área lesionada, ainda sim sem garantia de eliminação da micotoxina, e assim diminuir o risco de consumo de inhame contaminado com patulina. O risco à saúde pública devido à exposição à patulina produzida por *P. sclerotigenum* é ainda maior, pois *in vitro* Oliveira et al. (2006) testaram a capacidade de *P. sclerotigenum* infectar e se estabelecer em outra espécies

botânicas, além do gênero *Dioscorea*, sendo susceptíveis dentre as espécies testadas: maçã, banana, pêra e beterraba. Essas possibilidades de infecção sugerem pesquisas da concentração de patulina em tais alimentos.

A produção de patulina foi evidenciada em todos os três tipos de amostras analisadas (Figuras 2.4 e 2.5), sendo o inhame naturalmente infectado o que apresentou maior positividade 13 (59,1%) (Tabela 1), enquanto que a detecção nas amostras de inhame artificialmente infectado 11 (34,4%) e isolado fúngico 8 (25%) foram menores talvez devido as condições laboratoriais para produção da patulina, pois o gene *idh* foi detectado em tais amostras, com 90,7% (29) e 75% (24) respectivamente.

Dombrink-Kurtzman (2006) observou diferenças entre as sequências do gene *idh* de *P. expansum* e *P. griseofulvum* que foram correlacionadas à quantidade de patulina que cada espécie pode produzir, independente das condições laboratoriais, sendo que *P. griseofulvum* chegou a produzir patulina na ordem de 1,9 mg/ml, enquanto que a principal espécie contaminante de maçã, *P. expansum* produziu até 0,2 mg/ml.

A concentração máxima de patulina encontrada no inhame com podridão-verde no local da lesão considerando amostra naturalmente infectada foi 5,5mg/g de inhame (peso úmido). Concentrações de patulina em níveis tão altos foram encontrados também por Steine et al. (1999) que demonstraram presença de 0,5 a 2,5 mg/L de patulina em sucos de maçãs quando processadas com frutas deterioradas. Martins et al. (2002) avaliaram por TLC a ocorrência simultânea de patulina e citrinina em 351 amostras de maçãs deterioradas e entre as amostras a contaminação de patulina na cultivar Richared chegou a 80mg/kg de peso, confirmando alto risco para a saúde humana o consumo de derivados de maçãs que não sejam devidamente selecionadas.

As amostras de inhame naturalmente infectadas apresentaram mais positividade para a patulina por CLAE do que no PCR (Tabela 1) possivelmente devido à escassez de micélio de *P. sclerotigenum* na túbera (essencial para a extração de DNA e PCR) enquanto que o produto do metabolismo dele (patulina) permanece na túbera, mesmo na ausência do fungo, principalmente considerando que numa infecção natural não se tem informação sobre o tempo de infecção.

Dentre os 32 isolados brasileiros de *P. sclerotigenum* estudados 21 (65,6%) foram consistentemente positivos para a presença do gene *idh* e para a produção da patulina em amostras de inhame (Tabela 1), fato que corrobora com os resultados encontrados por Paterson et al. (2003) 66% de concordância ao aplicar as duas técnicas (PCR e CLAE) em *P. expansum* em amostras de maçãs, demonstrando a alta aplicação da associação das duas técnicas. Varga et al., 2003 observaram alta correlação (81%) entre a detecção do

gene *idh* e a produção de patulina por CLAE entre espécies do gênero *Aspergillus* seção *Clavati*.

Paterson (2006) publicou revisão sobre a identificação e quantificação de fungos toxigênicos por PCR e observou que entre os artigos publicados até o momento não houve qualquer resultado incoerente que resultasse em PCR para o gene *idh* negativo com a detecção da patulina por CLAE positiva. Pois mesmo nas amostras inicialmente inconsistentes, ao repetir a PCR com nova amostra de DNA, o gene *idh* era amplificado em tal amostra.

Puel et al. (2007) avaliaram o potencial de produção de patulina em 19 linhagens de duas espécies de *Byssochlamys* relacionando com a detecção de dois genes envolvidos na via biossintética da patulina e CLAE, a saber: *pks* codante da enzima policetídeo sintase e *idh* da enzima isoeopoxidon desidrogenase. Os autores observaram que as oito linhagens de *B. nivea* apresentaram os dois genes e produziram patulina nos teste de CLAE, enquanto nenhuma das 11 linhagens de *B. fulva* apresentaram os genes em estudo. Os autores concluíram que a ausência dos genes em *B. fulva* pode explicar a incapacidade de produção de patulina por essa espécie fúngica.

É importante salientar que as linhagens de *P. sclerotigenum* positivas para PCR e negativas para presença de patulina 16 (50%), podem indicar que: 1. Alguma parte da via metabólica de síntese de patulina não funcionou embora o gene *idh* estivesse intacto; 2. A patulina pode estar sendo produzida abaixo do limite de detecção do sistema cromatográfico utilizado que objetivou detectar quantidades acima do limite máximo permitido no local da lesão do inhame, daí a curva de calibração da patulina no CLAE ter sido realizada entre 62,5µg e 1mg/ml; 3. As condições laboratoriais não foram suficientes para produção de patulina por todos os isolados de *P. sclerotigenum*, mesmo cultivando o fungo no meio de cultura YES utilizado para classificação taxonômica baseada na produção de extrólitos em *Penicillium* (Svendsen e Frisvad, 1994). Além disso, ainda foram estabelecidas as condições ótimas de produção de patulina por *P. sclerotigenum* em inhame e frutas.

Elhariry et al. (2011) isolaram entre 34 linhagens de *Penicillium* provenientes de amostras de maçãs para fabricação de suco. Dezesete isolados foram identificados como sendo *P. expansum* (2 originários de maçãs aparentemente saudáveis e 15 de maçãs apodrecidas) utilizando-se primers para o gene da enzima PKS (poligalacturonase). O suco fabricado com partes saudáveis das maçãs apodrecidas apresentou patulina em análise por TLC (cromatografia de camada delgada). Desta forma, os autores enfatizaram a necessidade de maior rigor na seleção de maçãs para processamento, uma vez que a remoção de partes apodrecidas não elimina completamente a patulina do fruto.

A detecção do gene *idh* por PCR e sua relação com produção de patulina nas várias espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssosclamyces* já foram relatadas na literatura. Sendo assim, algumas linhagens fúngicas parecem ter perdido ou ganhado a capacidade através da evolução (Varga et al., 2003); e/ou devido a preservação (Santos et al., 2002).

Sendo assim, *P. sclerotigenum* pode ser detectado em inhame por PCR, usando o gene *idh* e a patulina, produto do seu metabolismo secundário que por sua vez pode igualmente ser detectada em inhame por CLAE.

4.0 Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro e ao Departamento de Antibióticos/UFPE pela disponibilidade das cepas bacterianas ATCC.

5.0 Referência

Abrunhosa, L.; Paterson, R.R.Rm.; Kozakiewicz, Z.; Lima, N.; Venancio, A., 2001. Mycotoxin production fungi isolated from grapes. Letters in Applied Microbiology. 32, 240-242.

Andersen, B. Smedsgaard, J.; Frisvad, J.C., 2004. *Penicillium expansum*. Consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 2421-2428.

ANVISA. 2011. Resolução- nº7, de 18 de fevereiro de 2011. Disponível em: < <http://www.anvisa.org.br>>. Acesso em: 01 de abril de 2011.

Asemota Hn., 1995. A fast, simple, and efficient miniscale method for the preparation of DNA from tissues of yam (*Dioscorea* spp.). Plant Molecular Biology Reporter 214 - 218.

Benett, J. W. ; Klich, M., 2003. Mycotoxins. Clinical of Microbiology Review. 16, 497- 516.

Berny, J. F ; Hennebert, G. L. ,1985. Variants of *Penicillium expansum*: an analysis of cultural and a microscopical characters as taxonomic criteria. In: Samson, R. A. & Pitt, J. L., eds. Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Plenum Press, New York, USA. 49-63.

Celli M.G, Coelho G.W, Garcia-Cruz C.H., 2009. Patulina: incidência e controle em derivados de maçã. Semina: Ciências Agrárias. 30,1,135-162.

Clarke, S. M. & Mckenzie, M. 1967. *Penicillium sclerotigenum*: a new source of griseofulvin. Nature. 4, 504-505.

Dombrink-Kurtzman , M A. 2006. The isoeopoxydon dehydrogenase gene of the patulin metabolic pathway differs for *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium expansum* Antonie van Leeuwenhoek 89, 1-8.

Elhariry, H.; Bahobial, A.A.; Gherbawy, Y., 2011. Genotypic identification of *Penicillium expansum* and the role of processing on patulin presence in juice. Food and Chemical Toxicology. (in press).

Figueiredo M.B., 2001.Métodos de preservação de fungos patogênicos. Biológico 63, 73-82.

Frisvad, J. C. & Samson, R. A., 2004. Polyphasic taxonomic of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. In: Samson, R.A. & Frisvad, J.C., (eds.) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and their extrolites. Studies in Mycology, 49, 1-174.

Frisvad, J. C; Smedsgaard, J.; Larsen, T. O. & Samson, R. A., 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In: Samson, R.A. & Frisvad, J. C., (eds.) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and their extrolites. Studies in Mycology, 49, 201-242.

- Frisvad, J. C ; Filtenborg, O. ,1990. Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In: Samson, R.A. & Pitt, J.I. (eds.) Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Plenum Press, New York, USA 373-384.
- Gonçalves, E.; Pinto, M. M. & Felicio, J. D. , 2001. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de São Paulo de 1989-1999. **Biológico**. 63: 15-19.
- Joshi, B. K.; Wicklow, D. T. & Domd, P. F., 1999. Sclerotigenin: A new antiinsectan benzodiazepine from the sclerotia of *Penicillium sclerotigenum*. Journal of Natural Products. 62,650-652.
- Konietzny, U.; Greiner, R., 2003.The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. Brazilian Journal of Microbiology. 34,283-300.
- Larsen, T. O.; Frydenvang, K. & Frisvad, J. C. 2000.UV-guided screening of benzodiazepine producing species in *Penicillium*. Biochemistry Systematic Ecology. 28, 9, 881-886.
- Marek, P.; Annamalai, T.; Venkitanarayanan, K., 2003. Detection of *Penicillium expansum* by polymarese chain reaction. International Journal of Food Microbiology. 89,139-144.
- Marin, S.; Morales, H.; Hasan, H. A. H.; Ramos, A. J.; Sanchis, V. , 2006. Patulin distribution in Fuji and Golden apples contaminated with *Penicillium expansum*. Food Additives e Contamiantes, 12,1316-1322.
- Martins, M.I.; Gimeno, A.; Martins, H.M.; Bernardo, F., 2002. Co-occurrence of patulin and citrinin in portuguese apples with rotten spots. Food and Additives e Contaminants 6, 289-300.
- Menezes, M.; Assis, S.M.P.,2004. Guia prático de fungos fitopatogênicos. Ed. UFRPE. 187p.
- Moake, M. M.; Padilla-Zakour, O. I. & Worobo, R. W., 2005. Comprehensive review of patulin control methods in foods. Comprehensive reviews in food science and food safety. 1, 8-21.
- Moura, R. M., Pio Ribeiro, G., Coelho, R. S. B. & Silva Junior, J. N., 1976. *Penicillium sclerotigenum* Yamamoto, principal fungo causador de podridão em túberas de inhame

(*Dioscorea cayennensis* Lam.) em condições de armazenamento. Fitopatologia Brasileira. 5, 299-304.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Approved standard M7-A6, 2003.

Okigbo, R. N. 2004. A review of biological control methods for post harvest yams (*Dioscorea* spp.) in storage in south eastern Nigeria. Science Journal. 1, 1-9.

Oliveira, I.S. 2005. *Penicillium sclerotigenum*, agente etiológico da podridão-verde do inhame: patogenia, distribuição geográfica, caracterização morfofisiológica e enzimática. Tese de Doutorado. UFPE – Recife, 108p.

OLIVEIRA IS, MOURA RM, LUZ EDMN, MAIA L., 2006. Patogenicidade de *Penicillium sclerotigenum* a diferentes frutas e hortaliças em pós-colheira. Fitopatologia Brasileira 31, 408-410.

Oliveira IS.; Luz Edmn.; Moura RM, Maia LC.; 2007. Distribuição Geográfica e Diversidade Morfológica de Culturas de *Penicillium sclerotigenum* em Inhames no Brasil. Fitopatologia brasileira. 32, 131-136.

Oliveira IS, Luz Edmn, Moura RM, Melo AP, Rezende, RP, Maia LC. ,2007. Eletroforese de isoenzimas diferencia espécies de *Penicillium* causadoras da podridão-verde em inhame. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia. Recife.

Paterson, R.R.M; 2007. The isoepoxydon dehydrogenase gene PCR profile is useful in fungal taxonomy. Revista Iberoamericana de Micologia 24, 289-293.

Paterson R.R.M., 2006. Primers from the isoepoxydon dehydrogenase gene of the patulin biosynthetic pathway to indicate critical control points for patulin contamination of apples. Food Control, Amsterdam. 17, 741-744.

Paterson, R.R.M., 2004. The isoepoxydon dehydrogenase gene of patulin biosynthesis in cultures and secondary metabolites as candidate PCR inhibitors. Mycological Research. 108, 1431-1437.

- Paterson, R.R.M; Kozakiewicz, Z.; Locke, T.; Brayford, D.; Jones, S.C.B., 2003. Novel use of the isoepoxydon dehydrogenase gene of the patulin metabolic pathway and chromatography to test penicilia isolated from apple production systems for the potencial to contaminate apple juice with patulin. *Food Microbiology*. 20, 359-364.
- Pedersen, L.H; Skoube, P.; Boysen, M.; Soule, J.; Rossen, L., 1997. Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. *Internacional Journal of Food Microbiology*. 35, 169-177.
- Puel, O.;Oswald,I. , 2010.P. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins*. 2,613-631.
- Puel, O.; Tadrist, S.; Delaforge, M.; Oswald, I.P.; Lebrini, A. 2007. The inability of *Byssochlamys fulva* to produce patulin is related to absence of 6-methylsalicylic acid synthase and isoepoxydon dehydrogenase genes. *International Journal of Food Microbiology*. 111,131-139.
- Raeder, U.; Broda,P., 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1,17-20.
- Rychlik M, Schieberle P.,2001.Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxinpatulin in apples, tomatoes, and wheat bread. *European Food Research and Technology*. 212: 274-278.
- Samson, R. A; Seifert, K. A.; Kuijpers, A. F. A.; Houbraken, J. A. M. P. & Frisvad, J. C. , 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subg. *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. In: Samson, R.A .& Frisvad, J. C., (eds) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and their extrolites. **Studies in Mycology**, 49,175-200.
- Santos, I.M.; Abrunhosa, L.; Venâncio, A.; Lima, N., 2002. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. *Letters in Applied Microbiology*. 35, 272-275.

Santos, E. S.,2002. Comercialização do Inhame no Mercado do Nordeste Brasileiro. In: CARMO, C. A. S. Inhame e Taro. Sistemas de Produção Familiar. INCAPER, Espírito Santo, 127-135

Steiner, I.; Werner, D.; Washutti, J. , 1999. Patulin in fruit juices. Part I. Analysis and control in Australian apple and pear juices. Ernährung 23, 202-208.

Svendsen, A.; Frisvad, J.C., 1994. A chemotaxonomic study of the terverticillate penicillia based on high performance liquid chromatography of secondary metabolites. 98,1317-1328.

Taniwaki, M. H., Hoenderboom, C. J. M., DE Almeida Vitali, A.; 1992. Uboldi Eiroa, M. N Migration of patulin in apples. Journal of Food Protection, 55, 8, 902-904.

Varga, J.; Rigó, K.; Molnar, J.; Toth, B.; Szencz, S.; Teren, J. Kozakiewicz, Z., 2003. Mycotoxin production and evolutionary relationships among species of Aspergillus section Clavati. Antonite von Leeuwenhoek. 83,191-200.

Yamamoto, W.; Yoshitani, K & Maeda, M.,1955. .Studies on the Penicillium and Fusarium rots of chinese yam and their control. The science reports of the Hyogo University of Agriculture. Series Agriculture 2,69-79.

Apêndice

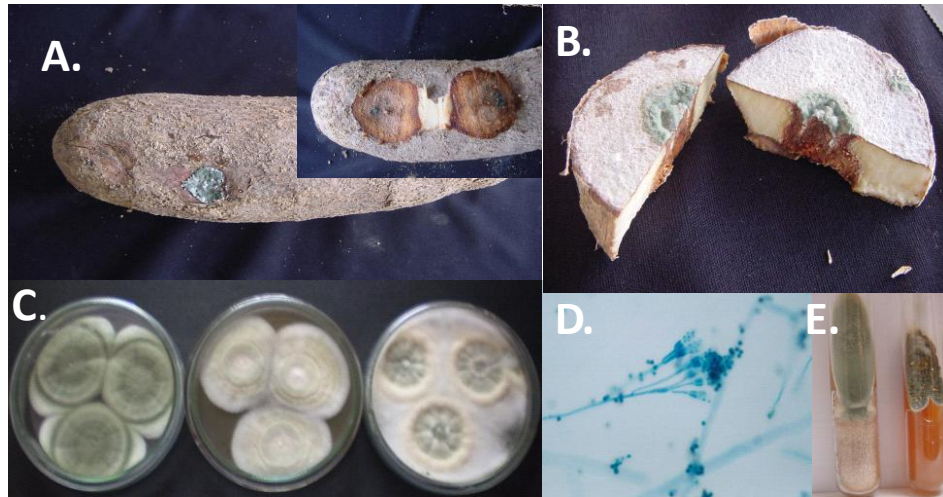
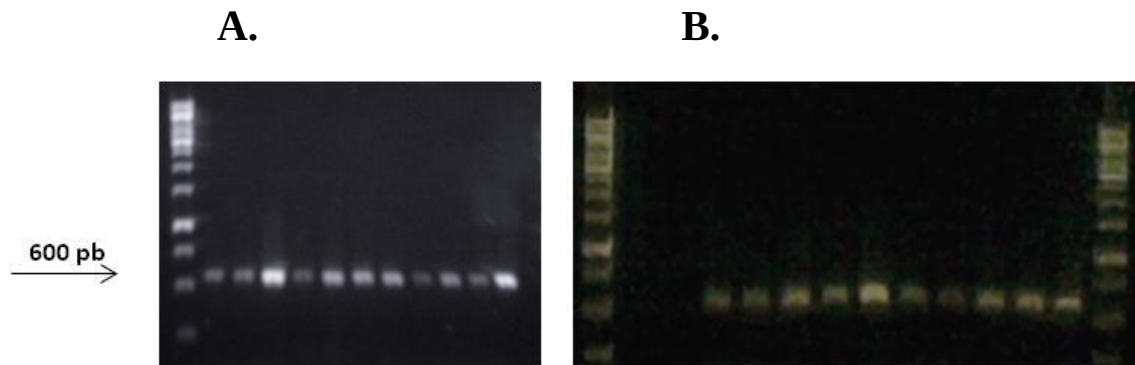


Figura 2.1 A. Túbera comercial de inhame da Costa com podridão-verde e acima o destaque para a área de necrose marrom; B. Rodela de inhame com infecção artificial. C. Cultivo de *P. sclerotigenum* nos meios de cultura CYA, MEA e YES a 25°C. D. Conidióforo biverticilado assimétrico. E Cultivo em tubo contendo CYA de *P. sclerotigenum* (presença de esclerócios) e ao lado *P. expansum*.



752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777

Figura 2.2 Gel de agarose a 1% dos produtos de PCR do gene *idh*. Amostras de isolados de *Penicillium sclerotigenum* (A) e (B). Da esquerda para direita dois controles negativos* e demais amostras de inhame natural e artificialmente infectados. PM – 1kb. Seta indica o produto de amplificação de 600pb. * Controles negativos -mix de PCR sem DNA e com DNA inhame não infectado.

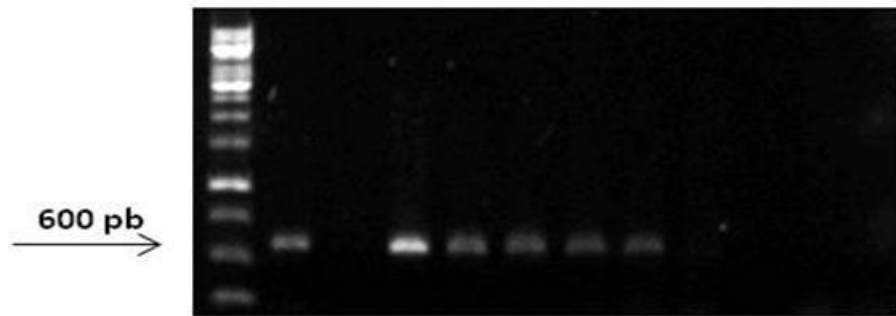


Figura 2.3 Amplificação do gene *idh* da via de biossíntese da patulina em isolados de *P. sclerotigenum* e outras espécies contaminantes de inhame. Da esquerda para direita, controle positivo (*P. expansum* 331), controle negativo da PCR, cinco isolados de *P. sclerotigenum* PE03, PE12, PE 14, PE 21, DF02, *P. oxalicum* (4254URM), *P. citrinum* (4216 URM), *P. chrysogenum* (3754 URM), *Aspergillus niger* (4709 URM). PM – 1kb. Seta indica o produto de amplificação de 600pb.

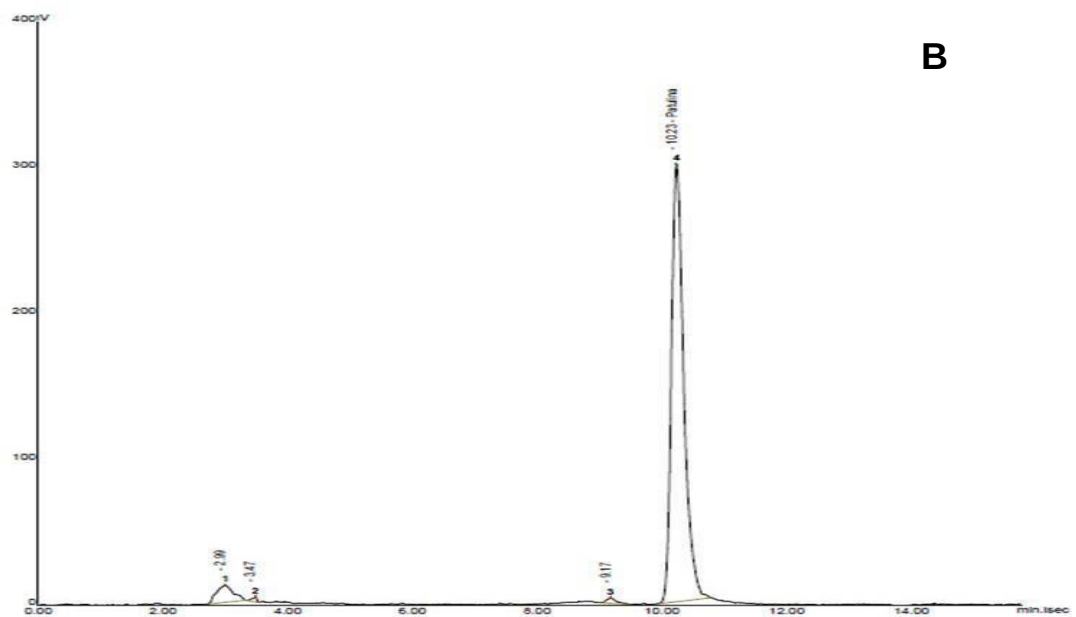
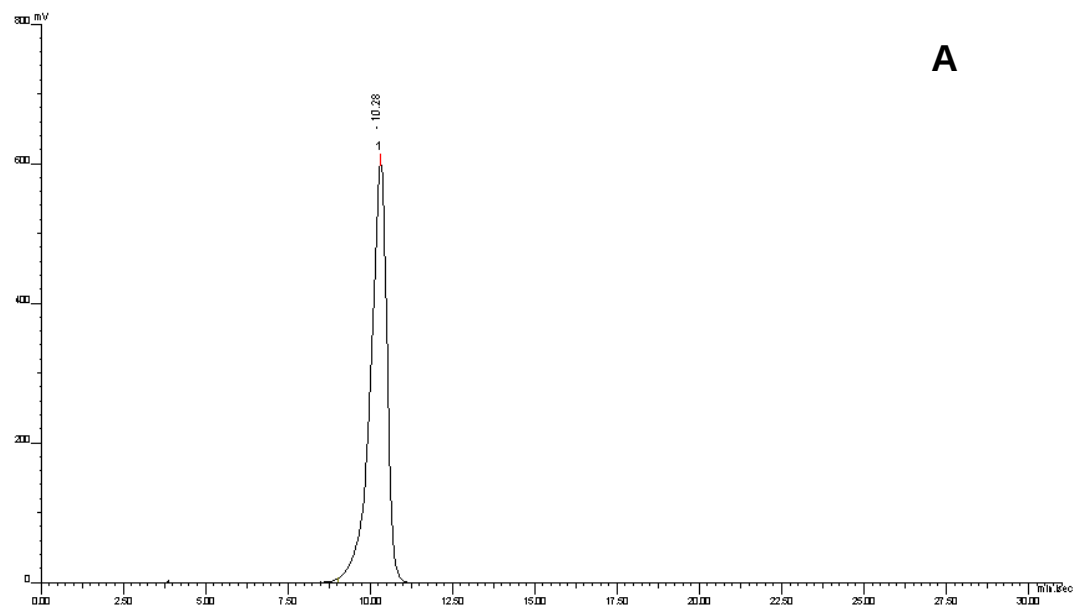


Figura 2.4 Cromatograma da micotoxina patulina por CLAE . A. padrão (sigma). B – inhame naturalmente infectado.

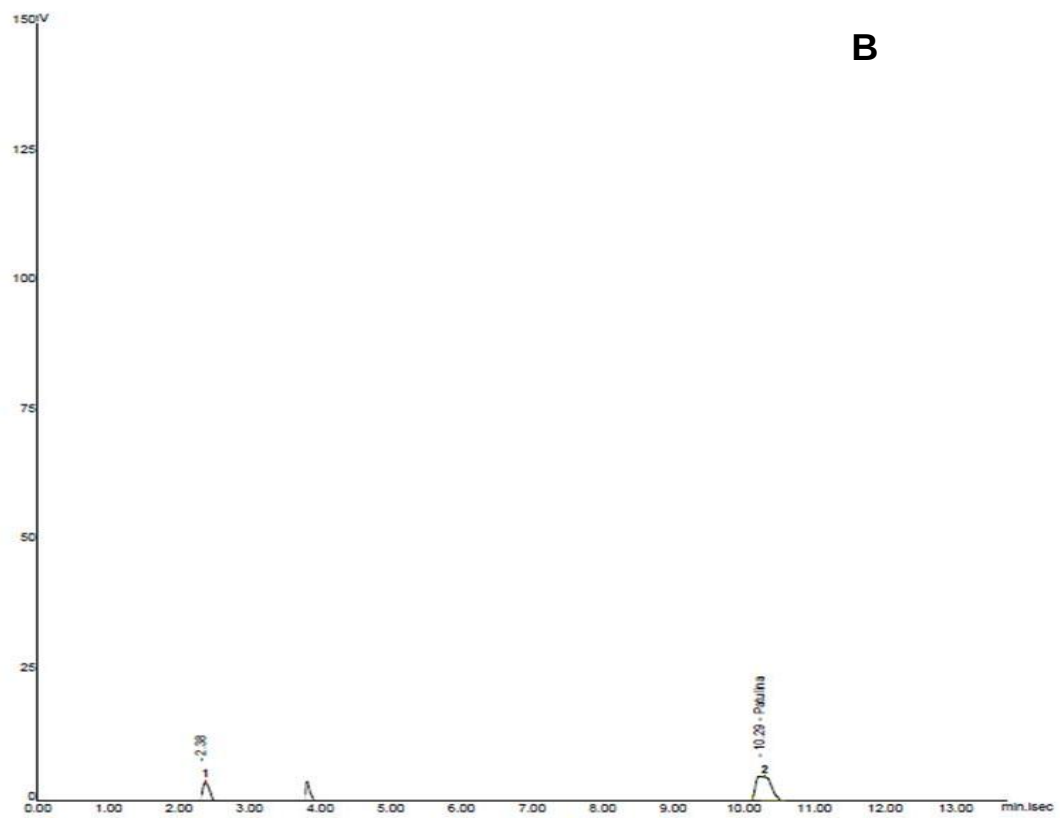
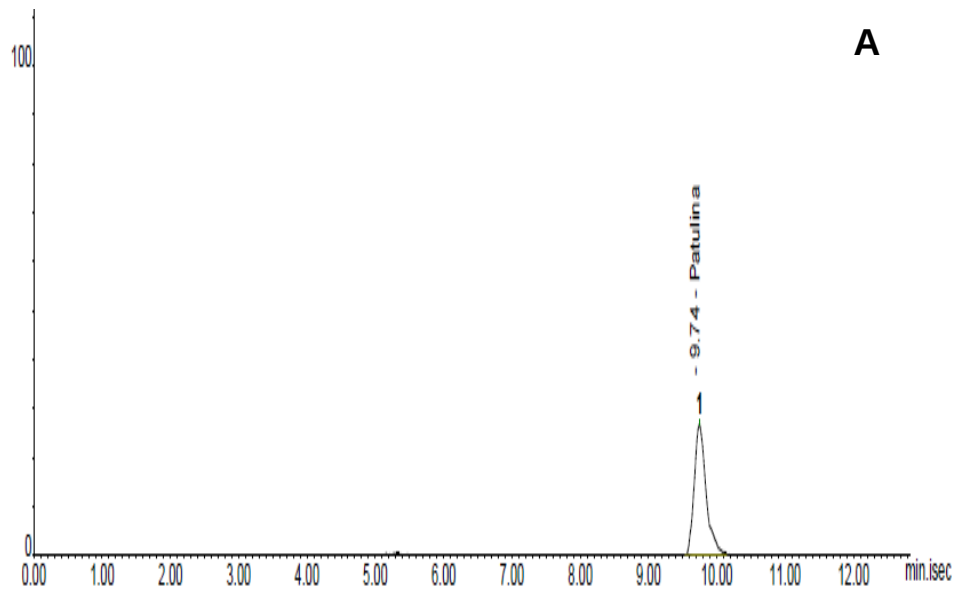


Figura 2.5 Cromatograma da micotoxina patulina por CLAE. A – inhame artificialmente infectado. B – isolado PE 12 de *P. sclerotigenum*.

Tabela 2.1 Resultados da detecção do gene *idh* (PCR) e presença de patulina (CLAE) para isolados de *Penicillium sclerotigenum* e amostras de inhame com podridão-verde em infecção natural e artificial.

	Inhame Naturalmente infectado (N = 22)			Isolado fúngico (N = 32)			Inhame artificialmente infectado (N = 32)		
Patulina positiva (CLAE)	PE01, PE02, PE03, PE04, PE07, PE08, PE09, PE12, PE13, PE14, PE16, PE17, PE75			PE03, PE21, MT04, MA01	PE12, DF02,RO 10,	PE14,	PE04, PE58, RO10, MA05, RN02	PE17, SP02, MT04,	PE21, PB01, MA01,
	n = 13 (59, 1%)			n = 8 (25%)			n = 11 (34,4%)		
Gene <i>idh</i> positivo (PCR)	PE01, PE02, PE08, PE09, PE10, PE13, PE16, PE17, PE21			PE01, PE04, PE11, PE16, PE21, PE75, PB01, MA01, MA05, RN02	PE02, PE05, PE12, PE18, PE39, SP02, RO10, MT04,	PE03, PE06, PE14, PE19, PE58, DF02, MT04,	PE01, PE05, PE09, PE13, PE16, PE19, PE39, DF02, MT04,	PE02, PE07, PE10, PE14, PE17, PE20, PE58, PB01, MA01, MA05, RN02	PE03, PE08, PE11, PE15, PE18, PE21, SP02, RO10, MA05,
	n = 9 (40,9%)			n = 24 (75%)			n = 29 (90,7%)		
PCR e CLAE positivos	PE01, PE02, PE03, PE08, PE09, PE13, PE16, PE17			PE03, PE21, MT04, MA01	PE12, DF02, MT04, MA01	PE14, RO10,	PE04, PE58, RO10, MA05, RN02	PE17, SP02, MT04,	PE21, PB01, MA01,
	n = 8 (36,4%)			n = 8 (25%)			n = 11 (34,4%)		

Total de amostras positivas na detecção do gene *idh* e presença de patulina = **21 (65,6%)**

Legenda: N – número total de amostras analisadas. n – número total de amostras positivas

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A podridão-verde do inhame é uma doença fúngica prevalente no Brasil especialmente na região Nordeste em períodos chuvosos, ocasionando prejuízos aos produtores exportadores de inhame. O agente etiológico *Penicillium sclerotigenum* ocorreu em vários estados brasileiros estudados.

A detecção do gene *idh* por PCR e sua relação com produção de patulina nas várias espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssosclamyces* já foram relatadas na literatura. Sendo assim, algumas linhagens fúngicas parecem ter perdido ou ganhado a capacidade através da evolução e/ou devido a preservação. Os resultados obtidos permitem concluir que:

Isolados brasileiros de *Penicillium sclerotigenum* possuem o gene *idh* da via metabólica de síntese da patulina e produzem a micotoxina *in vitro* e *in vivo* no inhame;

Foi detectada pela primeira vez a presença do gene *idh* e da patulina em inhame com podridão-verde causada por *Penicillium sclerotigenum*. Tal micotoxina esteve presente em altas concentrações no local da lesão, especialmente em inhame naturalmente infectado;

A PCR para o gene *idh* pode ser mais uma ferramenta de identificação de *Penicillium sclerotigenum* em inhame uma vez que as outras espécies contaminantes do inhame não produzem patulina.

REFERÊNCIAS

ADENIJI, M.O. Fungi associated with storage decay of yams in Nigeria. *Phytopathology* v.60, p.590-592, 1970.

ALVES, R. M. L & GROSSMANN, M. V. E. Parâmetros de extrusão para produção de “snacks” de farinha de cará (*Dioscorea alata*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 22, p.32-38, 2002

AMUSA, N. A.; ADEGBITE, A. A.; MUHAMMED, S.; BAIYWU, R. A. Yam diseases and its management in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 497-502, 2000.

ARTIGOT, M.P.; LOISEAU, N.; LAFFITTE, J.; MAS-REGUIEG, L.; TADRIST, S.; OSWALD, I.P.; PUEL, O. Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*. **Microbiology**, n. 155, p.1738–1747, 2009

BAERT, K.; VALERO, A.; MEULENAER, B.; SAMAPUNDO, S.; AHMED, M.M.; BO, L.; DEBEVERE J.; DEVLIEGHERE F. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *Int. J.Food Microbiol.*, n.119, p. 170-181,2007.

BECK, J.; RIPKA, S.; SIEGNER, A.; SCHILTZ, E.; SCHWEIZER, E. The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases. **Eur. J. Biochem**.n.192, p.487–498, 1990.

BELOFSKY, G. N.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F.; *J. Nat. Prod.*, v.61, 1115, 1998.

BENFORD, D.; BOYLE, C.; DEKANT, W.; FUCHS, R.; GAYLOR, D.W.; HARD, G.; MCGREGOR, D.B.; PITT, J.I.; PLESTINA, R.; SHEPHARD, G.; SOLFRIZZO, M.; VERGER, P.J.P.; WALKER, R. Ochratoxin A. In: **WHO Food Additives Series 47- FAO Food and Nutrition**, paper 74, 281-415, 2001

BIRKINSHAW, J.H; MICHAEL, S.E.; BRACKEN, A.; RAISTRICK, H. Patulin in the common cold collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* Bainier. II. **Biochemistry and Chemistry**. *Lancet*, 245, 625,1943.

BULLERMAN, L.B. Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin producing molds. **Journal of Food Science**, Chicago, v.18, n.3, p.197-200, 1985

CAFÊU MC, SILVA GH, TELES HL, BOLZANI VS, ARAÚJO AR. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Quim. Nova**. v 28, p.991-995, 2005.

CLARKE, S. M. & McKENZIE, M. *Penicillium sclerotigenum*: a new source of griseofulvin. **Nature**. v.4, p. 504-505, 1967.

CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS. **Position paper on patulin**. The Hague:WHO/FAO, 1998. 8p

COURSEY, D. G. **Descriptors for yam (*Dioscorea* sp.)**, Rome, IBPGR Secretariat, 19 p, 1980.

DIEKMAN, M.A.; GREEN, M.L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**, v.70, p.1615- 1627, 1992.

DINIZ, S. P. S. **Micotoxinas**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 181p. 2002.

DOMBRINK-KURTZMAN , M A. The isoeipoxydon dehydrogenase gene of the patulin metabolic pathway differs for *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium expansum* Antonie van Leeuwenhoek v.89, p. 1 –8,2006.

DRUSCH S, RAGAB W. Mycotoxins in fruits, fruit juices and dried fruits. **J Food Prot**; v.66, n.8, p.1514–27, 2003.

ELLIS, M. B. Dematiaceous Hyphomycetes. VII: *Curvularia*, *Brachysporium* etc. Commonwealth Mycological Institute, **Mycological Papers**, England, n.106, 57p., 1966.

FAO. <http://www.fao.org>, **FAOSTAT, DATABASE, CROP PRIMARY**. Acesso em Dezembro 2009.

FAO. <http://www.fao.org>, **FAOSTAT, DATABASE, CROP PRIMARY**. Acesso em Janeiro 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Worldwide regulations for mycotoxins 1995**. Rome: FAO,p.7-28,1997.

FRISVAD, J. C. & SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomic of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. In: Samson, R.A. & Frisvad, J.C., (eds.) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and their extrolites. **Studies in Mycology**, n 49 : 1-174. 2004.

FRISVAD, J. C; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O. & SAMSON, R. A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In: Samson, R.A .& Frisvad, J. C., (eds.) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and their extrolites. **Studies in Mycology**, n 49, p.201-242, 2004.

FUJII, I.; ONO, Y.; TADA, H.; GOMI, K.; EBIZUKA, Y.; SANKAWA, U. Cloning of the polyketide synthase gene atX from *Aspergillus terreus* and its identification as the 6-methylsalicylic acid synthase gene by heterologous expression. *Mol. Gen. Genet.*,n. 253,p. 1–10, 1996.

GARRIDO, M. D. S. **Manejo agroecológico da cultura do inhame: produtividade, qualidade, controle de nematóides e manchas foliares**. 2005. 73p. Dissertação. (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Bahia, Escola de Agronomia, Cruz das Almas,Bahia, 2005.

GAUCHER, G.M. Mycotoxins – their biosynthesis in fungi: patulin and related carcinogenic lactones. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.42, n.10, p.810-814, 1979.

GÖKMEN, V.; ACAR, J.; SARIOĞLU, K. Liquid chromatographic method for the determination of patulin in apple juice using solid-phase extraction. **Analytica Chimica Acta** 543: 64 – 69, 2005.

HAYES, A.W.; PHILLIPS, T.D.; WILLIAMS, W.L.; CIEGLER, A. Acute toxicity of patulin in mice and rats. *Toxicology*, n.13, p.91–100, 1979.

HENNIGEN, M.R.; SANCHEZ, S.; DI BENEDETTO, N.M.; LONGHI, A.; TORROBA, J.E.; VALENTE SOARES, L.M. Fumonisin levels in commercial corn products in Buenos Aires, Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.1, p.55-58, 2000a.

HENNIGEN, M.R.; VALENTE SOARES, L.M.; SANCHEZ, S.; DI BENEDETTO, N.M.; LONGHI, A.; EYHÉRABIDE, G.; TORROBA, J.E.; ZANELLI, M. Fumonisin in corn hybrids Grown in Argentina for two consecutive seasons. In: DE KOE, W.J.; SAMSON, R.A.; VAN EGMOND, H.P.; GILBERT, J.; SABINO, M. (eds.) **Proceedings of the Xth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins** – n. 9, p.331-339, 2000b.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Review: toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. GENEVA: WORLD HEALTH Organization; Fifty-sixth meeting, 2001

JOSHI, B. K.; WICKLOW, D. T. & DOMD, P. F. Sclerotigenin: A new antiinsectan benzodiazepine from the sclerotia of *Penicillium sclerotigenum*. **Journal of Natural Products**. n62, p.650-652,1999.

KATAOKA, H.; ITANO, M.; ISHIZAKI, A.; SAITO, K. Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. n. 1216, p. 3746-3750, 2009.

KAWASHIMA, LUCIANE MIE, **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2004. (Tese de Doutorado)– Campinas, SP, 2004.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.34, p. 283-300, 2003.

KOROLKOVAS, A.; BURKHALTER, J. H.; *Química Farmacêutica*, Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, 1988.

LANÇAS, F.M. Métodos Cromatográficos de Análise: Extração em Fase Sólida. São Carlos: RiMa, 2004.

LARSEN, T. O.; FRYDENVANG, K. & FRISVAD, J. C. UV-guided screening of benzodiazepine producing species in *Penicillium*. **Biochemistry Systematic Ecology**. n.28, v.9, p. 881-886, 2000.

LÁZZARI, A. F. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba: Pallotti, 1993. 133 p.

LI, S., MARQUARDT, R.R, FROHLICH, A.A., VITTI, T.G., AND CROW, G. Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology** p.145:82, 1997.

MACHINSKI JR, M. & VALENTE SOARES, L.M. Fumonisin B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.10, p.875 -9, 2000.

MAGAN N, OLSEN M. Mycotoxins in Food: Detection and Control. 1st ed. **CRC Press**; 2004.

MALAUURIE, B.; TROUSLOT, M-F.; BERTHAUD, J.; BOUSALEM, M.; PINEL, A.; DUBERN, J. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. **EJB Eletronic Journal of biotechnology**, London, v. 1, n. 3, p. 1-15, 1998.

MAREK, P.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. Detection of *Penicillium expansum* by polymerease chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*. v.89,p.139-144, 2003

MARTINS, M.I.; GIMENO, A.; MARTINS, H.M.; BERNARDO, F. co-occurrence of patulin and citrinin in portuguese apples with rotten spots. *Food and Additives e Contaminants*.v. 6, p. 289-300, 2002

MATTHÄUS, K.; DÄNICKE, S.; VAHJEN, W.; SIMON, O.; WANG, J.; VALENTA, H.; MEYER, K.; STRUMPF, A.; ZIESENIß, H.; FLACHOWSKY, G. Progression of mycotoxin and nutrient concentrations in wheat after inoculation with *Fusarium culmorum*. **Archives of Animal Nutrition**, v.58, p.19-35, 2004.

MCKINLEY, E.R.; CARLTON, W.W. Patulin mycotoxicosis in the Syrian hamster. *Food Cosmet. Toxicol.*, n.18, p.173–179,1980.

MCKINLEY, E.R.; CARLTON, W.W.; BOON, G.D. Patulin mycotoxicosis in the rat: Toxicology, pathology and clinical pathology. *Food Chem. Toxicol.*, n.20,p. 289–300, 1982.

MEDEIROS, A. G. & NASCIMENTO, M. L. N. Ocorrência de *Curvularia maculans* (Bancroft) Boedijn var. *macrospora*, nova variedade, em folhas de cará (*Dioscoreaceae*) no Estado de Pernambuco. Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco (IPA), **Boletim Técnico** n7, 9p, 1964

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Appied Microbiology Symposium**, v. 84, n. 27, p. 62S-72S, 1998.

MOURA, R. M. Doenças do inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis*). In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. **Manual de Fitopatologia, Doenças das Plantas Cultivadas**. Editora Agronômica CERES, São Paulo. v.2, p.415-419,2005.

MOURA, R. M. Efeito de benomyl no controle da podridão verde do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) em condições de armazenamento. **Fitopatologia Brasileira**. v. 5, p.299-304, 1980.

MOURA, R. M. Podridão aquosa, uma nova doença do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) causada pelo fungo *Rhizopus orizeae*. **Fitopatologia Brasileira**. v.12, p. 369-373, 1987.

MOURA, R. M., PIO RIBEIRO, G., COELHO, R. S. B. & SILVA JUNIOR, J. N. *Penicillium sclerotigenum* Yamamoto, principal fungo causador de podridão em túberas de inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) em condições de armazenamento. **Fitopatologia Brasileira**. v.5, p. 299-304, 1976.

NNODU, E. C. & NWANKITI, A O. Chemical control of post-harvest deterioration of yam tubers. **Fitopatologia Brasileira**. v.11, p. 865–871,1986.

NORTHOLD, M.D. et al. Patulin production by some fungal species in relation to water activity and temperature. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.41, n.11, p.885-890, 1978.

OGUNDANA, S.K., NAQIV, S.H.Z. & EKUNDAYO, J.A. Fungi associated with soft-rot of yams (*Dioscorea* spp.) in storage in Nigeria. Transactions British Mycology Society n.54, p.445-451,1970.

OH, H. B.; GLOER, J.; WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F.; *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 702

OKIGBO, R. N. A review of biological control methods for post harvest yams (*Dioscorea* spp.) in storage in south eastern Nigeria. **Science Journal**. v . 1, p. 1-9, 2004.

OKIGBO, R. N. Mycoflora of tuber surface of White yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) and postharvest control of pathogens with *Bacillus subtilis*. **Mycopathologia**. n 156,p. 81-85, 2002.

OLIVEIRA, A. P.; BARBOSA, L. J. N.; PEREIRA, W. E.; SILVA, J. E. L.; OLIVEIRA, A. N. P. Produção de rizóforos comerciais de inhame em função de doses de nitrogênio. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n.1, p.73-76, 2007.

OLIVEIRA, I.S. *Penicillium sclerotigenum*, agente etiológico da podridão-verde do inhame: patogenia, distribuição geográfica, caracterização morfofisiológica e enzimática. **Tese de Doutorado**. UFPE – Recife, 108p, 2005

OVERY, D. P.; PHIPPIS, R. K.; FRYDENVANG, K.; LARSEM, T. O.; **Biochem. Syst. Ecol.**, v34, 345p, 2006.

PEDERSEN, L.H; SKOUBE, P.; BOYSEN, M.; SOULE, J.; ROSSEN, L. Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. **Internacional Journal of Food Microbiology**. v.35, p.169-177, 1997.

PARK, D. L.; POHLAND, A. E. A rationale for the control of aflatoxin in animal feeds. In: STEYN, P. S.; VLEGGAR, R. (Eds.). **Mycotoxins and phycotoxins**. Amsterdam: Elsevier Applied Science. p. 473-482,1986.

PATERSON, R.R.M; The isoepoxydon dehydrogenase gene PCR profile is useful in fungal taxonomy. **Revista Iberoamericana de Micologia**. V.24, p.289-293, 2007.

PATERSON RRM. Primers from the isoepoxydon dehydrogenase gene of the patulin biosynthetic pathway to indicate critical control points for patulin contamination of apples. **Food Control**, Amsterdam. v 17, p.741-744,2006.

PATERSON, R.R.M. The isoepoxydon dehydrogenase gene of patulin biosynthesis in cultures and secondary metabolites as candidate PCR inhibitors. **Mycological Research**. v.108, p. 1431-1437, 2004.

PATERSON, R.R.M.; KOZAKIEWICZ, Z.; LOCKE T.; BRAYFORD D.; JONES, SCB. Novel use of the isoepoxydon dehydrogenase gene probe of the patulin metabolic pathway and chromatography to test penicillia isolated from apple production systems for the potential to contaminate apple juice with patulin. **Food Microbiol** n. 20, p. 359–364, 2003.

PETERSON, S. W. Phylogenetic analysis of *Penicillium* species based on ITS and LSU-rDNA nucleotide sequences. In: Samson, R. A. & Pitt, J. I. (eds.) **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Harwood Academic Publishers. Amsterdam. The Netherlands. p.163-188, 2000.

PITT .J.I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: **Academic Press**, 2000.

PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. Academic Press, London, UK. 634p, 1979.

PUEL, O.;OSWALD,I. P. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. **Toxins**. v. 2, p.613-631, 2010.

PUEL, O.; TADRIST, S.; DELAFORGE, M.; OSWALD, I.P.; LEBRINI, A. The inability of *Byssoschlamys fulva* to produce patulin is related to absence of 6-methylsalicylic acid synthase and isoeopoxygen dehydrogenase genes. **International Journal of Food Microbiology**. v.111, p.131-139, 2007.

RANCIC A, SOKOVIC M, KARIOTI A, VUKOJEVIC J, SKALTSA H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. **Env Tox Pharmacol**.; v.22, p.80–4. 2006.

RAPER, K. B. & THOM, C. **A manual of the Penicillia**. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 843p. ,1949.

READ G.; WESTLAKE, D.W.; VINING, L.C. Quinone epoxides V The biosynthesis of terreic acid. *Can. J. Biochem.*, n.47, p.1071–1079, 1969.

RILEY, R. T.; PESTKA, J. Mycotoxins: metabolism, mechanisms and biochemical markers. In: DIAZ, D. E. (Ed.). **The mycotoxin blue book**. Nottingham: Nottingham University Press, p. 279-294,2005.

RITZINGER, C. H. S. P.; SANTOS FILHO, H. P.; ABREU, K. C. L. M.; FANCELLI, M. & RITZINGER, R. **Aspetos Fitossantários da Cultura do Inhame**. EMBRAPA, Documentos, Cruz das Almas. 2003.

ROCHA, M. D.; MAIA, P. P.; RODRIGUES, M. A. C, MARTINS, I. Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil. **Revista Brasileira de Toxicologia** v.21, n.1, p. 15 – 19, 2008

ROSS, G.U.; TANIWAKI, M.H.; SABINO, M.; VIZONI, T.; HIROOKA, E.Y.; Produção de patulina em maçã (*malus domestica* borkhausen), cultivares gala e fuji inoculadas com *penicillium* spp. **Ciência e Tecnologia dos. Alimentos**, v.18, n.1, 1998.

RYCHLIK M, SCHIEBERLE P. Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. **European Food Research and Technology**. 2001; 212: 274-278

SAMSON, R. A. & PITT, J. I. **Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification**. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands. 510p, 2000.

SANT'ANA, A.S.; ROSENTHAL, A.; MASSAGUER, P.R. The fate of patulin in apple juice processing: A review. **Food Research International** v.41, p.441-453, 2008.

SANTOS, E. S. Comercialização do Inhame no Mercado do Nordeste Brasileiro. In: CARMO, C. A. S. **Inhame e Taro. Sistemas de Produção Familiar**. INCAPER, Espírito Santo, p.127-135, 2002.

SANTOS, E.S. **Inhame (*Dioscorea* spp.): aspectos básicos da cultura**. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 158p, 1996.

SCHMIDT-HEYDT M & GEISEN R A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. **Int J Food Microbiol** v.117, p.131–140, 2007.

SCUDAMORE, K.A. & PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives and Contaminants**, 17(5), 407-416, 2000

SCUSSEL,V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.

SEGNOU, C. A. Studies on the reproductive biology of white yam *Dioscorea rotundata* Poir). **Euphytica**, n.64, p. 197-203,1992.

SEWRAM, V.; NAIR, J.J.; NIEUWOUDT, T.W.; LEGGOTT, N.L.; SHEPHARD, G.S.Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 897: 365 – 374, 2000.

SHEPHARD, G.S.; LEGGOTT, N.L. Chromatographic determination of the mycotoxinpatulin in fruit and fruit juices. *Journal of Chromatography A* 882 p.17 – 22, 2000.

SILVA. A. A. **Observações Fenológicas em *Dioscorea cayennensis* Lam.** Arquivos do Instituto de Pesquisas Agronômicas (IPA). Secretaria de Indústria e Comércio de Pernambuco.v. 5, p. 117-191, 1965.

SONGSEMSAKUL, P.; RAZZAZI-FAZELI, E. A Review of Recent Trends in Applications ofLiquid Chromatography-Mass Spectrometry for Detection of Mycotoxins. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* v.31, p. 1641 – 1686, 2008.

STOLK, A. C & SAMSON, R. The ascomycete genus *Eupenicillium* and related *Penicillium* anamorphs. **Studies in Mycology**, n. 23, p. 1-148, 1983.

TANIWAKI, M. H., HOENDERBOOM, C. J. M., DE ALMEIDA VITALI, A., AND UBOLDI EIROA, M. N Migration of patulin in apples.**Journal of Food Protection**, v.55, n.8, p.902-904, 1992

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Commission Regulation (EC) No. 1881/2006–303-L364/17**. Brussels: Official Journal European Union, p.13-14, 2006.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; MOLNAR, J.; TOTH, B.; SZENCZ,S.; TEREN, J. KOZAKIEWICZ, Z. Mycotoxin production and evolutionary relationships among species of *Aspergillus* section *Clavati*. *Antonite von Leeuwenhoek*. v.83, p.191-200, 2003.

VINOKUROVA, N. G.; IVANUSHKINA, N. E.; KOCHIKINA, G. A.; ARIBASAROV, M. U.; OZERSKAYA, S. M.; *Appl. Biochem. Microbiol.*, v41, 83p., 2005.

WANG L, ZHOU HB, FRISVAD JC, SAMSON RA. *Penicillium persicinum*, a new griseofulvin, chrysogine, and roquefortine C producing species from Qinghai province, China. *Antonie van Leeuwenhoek*.n 86, p. 173–9,2004.

WANG, I.K.; REEVES, C.; GAUCHER, G.M. Isolation and sequencing of a genomic DNA clone containing the 3' terminus of the 6-methylsalicylic acid polyketide synthetase gene of *Penicillium urticae*. **Can. J. Microbiol.**, n.37, p.86–95, 1991.

WELKE, J.E.; HOELTZ,M.;DOTTORI, H.A.;NOLL, I.B. Ocorrência, aspectos toxicológicos, métodos analíticos e controle da patulina em alimentos. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.300-308, 2009.

WHITE, S.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A.D. Cloning and molecular characterization of *Penicillium expansum* genes upregulated under conditions permissive for patulin biosynthesis. **FEMS Microbiol. Lett**, n.255, p.17–26, 2006.

MOAKE, M.M.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; WOROBO, R.W. **Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. v.1, p. 8 – 21, 2005

YAMAMOTO, W.; YOSHITANI, K & MAEDA, M. Studies on the *Penicillium* and *Fusarium* rots of chinese yam and their control. **The science reports of the Hyogo University of Agriculture. Series Agriculture** v.2, p.69-79, 1955.

ANEXO- NORMAS DA REVISTA



INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY

An official journal of the International Union of Microbiological Societies (IUMS) and the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH)



DESCRIPTION

International Journal of Food Microbiology publishes contributions dealing with all aspects of food microbiology. Papers submitted for publication must be novel and of high scientific quality and impact. *International Journal of Food Microbiology* does not publish preliminary or confirmatory results. Fulllength original research papers, short communications, review articles and book reviews in the fields of bacteriology, immunology, mycology, parasitology, virology, food safety and food fermentation are welcomed. Emphasis will be placed on papers dealing with microbiological quality assurance, intrinsic and extrinsic parameters of foods affecting microbial survival and growth, microbial ecology of foods, microorganisms involved in food fermentations, including probiotics and starter cultures, methods for microbiological and immunological examinations of foods, as well as rapid, automated and molecular methods, indices of the sanitary quality of foods, incidence and types of food microorganisms, food spoilage, microbiological aspects of food preservation and novel preservation techniques, microbial interaction, predictive microbiology, food-borne diseases of microbial origin and the safety of novel food products. This journal also publishes special issues of selected, peer-reviewed papers from suitable meetings, workshops, conferences, etc, in the field of food microbiology.

AUDIENCE

.Industrial and food Microbiologists, Bacteriologists, Immunologists, Mycologists, Parasitologists, Virologists, Food Hygienists.

IMPACT FACTOR

.2009: 3.011 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2010

ABSTRACTING AND INDEXING

. AGRICOLA/ BIOSIS/ CAB Abstracts/ Cambridge Scientific Abstracts /Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences /EMBASE /EMBiology /Food Science and Technology Abstracts /MEDLINE®/ Science Citation Index/ Scopus

Editor-in-Chief

L. Coccolin, DIVAPRA, Faculty of Agriculture, Università di Torino, Via Leonardo da Vinci 44, 10095

Grugliasco, Torino, Italy, **Email:** lcocolin@gmail.com

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

- Full-length Research Articles are complete reports of original, scientifically sound research. They must contribute new knowledge and be organized as described in this Guide. Manuscripts should not exceed 8000 words. Please follow carefully the organization of the sections described in "Preparation of text files" (see below).
- Short Communications are brief reports of scientifically sound research, but of limited scope (for example, limited number of samples analysed), that contribute new knowledge. They should be prepared as described in this Guide, and should not exceed 4000 words. Please follow carefully the organization of the sections described in "Preparation of text files" (see below).
- Reviews are papers which provide an analysis of a scientific or applied field, which include all important findings and bring together reports from a number of sources. Manuscripts should not exceed 12,000 words (excluding references). Review articles may be invited by the Editor or the Editorial Board. Alternatively, potential authors considering the preparation of a Review article should contact the Editor to suggest the topic and its scope, providing an outline in the form of major headings and a summary statement. In any case, such articles are subject to the normal processes of peer review and revision.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who

must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification

that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre – and post-submission please visit

<http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor. Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references, tables etc. should be numbered; however, in the text no reference should be made to page numbers. **Lines must be numbered consecutively throughout the manuscript.**

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>. The Elsevier "elsarticle" LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article

structure

Subdivision

-

numbered

sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 400 words.

Research highlights

Research highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a

separate file in the online submission system. Please use 'Research highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point including spaces). See <http://www.elsevier.com/researchhighlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10^9 in America, 10^{12} in Europe) is ambiguous and should not be used. Units must be indicated as g/L and not gL⁻¹.

Math

formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. *Table* *footnotes*
Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

e-CRC

General points: Elsevier can only accept MS Word, LaTeX, or postscript/PDF documents as electronic camera-ready copy (e-CRC). Electronic files can be stored on CD or may be transferred to Elsevier via FTP (details available from Customer support: <http://support.elsevier.com>).

MS Word file: Please ensure that you use normal fonts as much as possible in your documents, such as Times New Roman, Arial, Symbol, Helvetica, or Times (TrueType or Type 1 fonts). Special fonts, such as those used in the Far East (Japanese, Chinese, Korean, etc.) may cause problems during processing. If you use a lot of special fonts, please convert the document to PDF with Adobe Acrobat (see below, and also Elsevier's Quickguide:

<http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/howtosubmitpaper>). Please place figures in a logical place within the document (see also the section on *Preparation of electronic illustrations* at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>). To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spellchecker" function of your wordprocessor.

LaTeX documents: Please use a LaTeX setup that uses Type 1 fonts instead of the sometimes default bitmap fonts (Type 3, or pk fonts). For instance, using the LaTeX Times package may be enough to enable this adjustment. For information on LaTeX see <http://www.elsevier.com/latex>. Please provide all document-related and temporary files on submission, as well as the resulting postscript or PDF file.

Postscript/PDF files: Please create postscript files, making sure all fonts are embedded. When creating PDF files with Adobe Acrobat, please use version 4.05 or higher, and use the standard "Press Optimized" settings, as provided by Adobe.

Artwork

Electronic

General

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
 EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".
 TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
 TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
 TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the

- resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
 - Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color

artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure

captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation

in

text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web

references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References

in

a

special

issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference

style

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the Authors. Please ensure that every reference cited within the text is also present in the reference list (and vice versa). Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list, they should follow the standard reference style and should include a substitution of the publication date with either "unpublished results" or "personal communication". Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. All citations in the text should refer to:

1. *Single author*: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. **Note that journal names are not to be abbreviated.** The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Examples:

Reference to a journal publication:
Ono, K., Yamamoto, K., 1999. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *International Journal of Food Microbiology* 47, 211-219.

Reference to a book:
Strunk Jr, W., White, E. B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:
Kramer, J.M., Gilbert, R.J., 1989. *Bacillus cereus*. In: Doyle, M.P. (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 22-70.

Caddick, M.X., 1994. Nitrogen metabolite repression. In: Martinelli, S.D., Kinghorn, J.R. (Eds.), *Aspergillus: 50 Years on, Progress in Industrial Microbiology*, vol. 29. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 323-353.

Video

data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 10 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic

and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary

data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission

checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

- One Author designated as corresponding Author:
- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded
- Keywords
- All tables (including figure title, description, captions)
- Further considerations
- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.